

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 168**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2010 PCT/EP2010/057726**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 10724472 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2437769**

54 Título: **Producción recombinante de péptidos**

30 Prioridad:

03.06.2009 EP 09161837

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.05.2020

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**HÜMMERICH, DANIEL;
LIEBMANN, BURGHARD;
FEHR, MARKUS;
SCHWALB, CARSTEN y
BRÜSER, HEIKE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 763 168 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción recombinante de péptidos

La presente invención hace referencia a proteínas precursoras repetitivas autoensamblantes, a secuencias de ácido nucleico codificantes y a constructos de expresión, así como a procedimientos para la producción recombinante de péptidos mediante la utilización de proteínas precursoras de esa clase.

Antecedentes de la invención

Las proteínas sintéticas repetitivas son conocidas, por ejemplo por la solicitud WO 2008/155304 A1. La solicitud WO 2006/008163 A3, la solicitud WO 2007/ 025719 A1, Hümmereich et al. (Biochem. 43; 13604-13612 (2004)) y Teule et al. (J. Mat. Sci. 42; 8974-8985 (2007)) describen proteínas de seda hilada que se componen de subunidades repetitivas. En la solicitud WO 2007/082936 A1 se describen proteínas autoensamblantes anfífilas para la formulación de sustancias de efecto poco solubles en agua, como por ejemplo proteínas sintéticas que se basan en unidades de repetición de proteínas de seda naturales.

Se conocen diferentes métodos para la producción biotecnológica de péptidos. Puesto que la estabilidad de cadenas de polipéptidos cortas en células huésped microbianas en general es reducida y los péptidos libres eventualmente pueden actuar de forma tóxica en el organismo huésped (por ejemplo péptidos antimicrobianos), en la mayoría de los métodos se forman proteínas precursoras más grandes, de las cuales se corta el péptido después de la depuración de la proteína precursora.

Una posibilidad para obtener una proteína precursora estable consiste en expresar un péptido junto con una proteína estable como proteína de fusión. Las propiedades de la proteína de fusión, las cuales tienen una gran influencia sobre los pasos de procesamiento subsiguientes, se determinan en alto grado independientemente de la secuencia de péptidos, desde la pareja de fusión, y con ello pueden controlarse bien y son adecuadas para la producción de péptidos con secuencias diferentes.

En la solicitud WO 2008/085543 se describe un procedimiento especial para la producción de proteínas y péptidos con la ayuda de una proteína de fusión. Esa proteína de fusión, junto con la secuencia de péptidos deseada, contiene una pareja de fusión que se encarga de que la proteína de fusión muestre un comportamiento de transición de fases inverso. Ese comportamiento, por una parte, permite una depuración sencilla y conveniente en cuanto a los costes de la proteína de fusión, desde el contexto celular. Por otra parte, la separación de la pareja de fusión, después de la escisión proteolítica del péptido, puede realizarse igualmente de forma sencilla y conveniente en cuanto a los costes. Mientras que una proteína de fusión con frecuencia puede obtenerse con buenos rendimientos, la parte del péptido en la proteína precursora en general es reducida y, con ello, la eficiencia del proceso no es óptima.

Por otra parte se producen de forma recombinante proteínas precursoras repetitivas que contienen varias copias del péptido deseado. En la solicitud WO 03/089455 se describe la producción de proteínas precursoras multiméricas, de las cuales, mediante disociación de ácido, se cortan las secuencias de péptidos deseadas que presentan propiedades antimicrobianas.

Existe una serie de otros principios publicados (Ejemplos: Metlitskaya et al. Biotechnol Appl. Biochem 39; 339-345 (2004); Wang & Cai Appl. Biochem and Biotechnol. 141; 203-213 (2007)), con los cuales se ha demostrado que secuencias de péptidos o familias de secuencias de péptidos pueden producirse según un procedimiento determinado, con la ayuda de proteínas precursoras repetitivas. Se ha descrito parcialmente la utilización de secuencias auxiliares especiales que están dispuestas entre las repeticiones de las secuencias de péptidos deseadas. En particular se han propuesto secuencias auxiliares aniónicas que deben reducir el efecto perjudicial de secuencias de péptidos catiónicas antimicrobianas dentro de una proteína precursora repetitiva en la célula huésped (véanse por ejemplo la solicitud WO 00/31279, Lee et al. Prot. Expr. Purificat. 12; 53-60 (1998); la solicitud WO 98/54336 A1; Kim et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72; 330-338 (2006) y la solicitud US 2003/0219854). Mientras que en ese principio repetitivo de la proteína la parte de la secuencia de péptidos deseada en la proteína precursora es más elevada, las propiedades de la proteína precursora repetitiva son influenciadas en alto grado por la secuencia del péptido catiónico deseado.

Para los inventores hasta el momento no es conocido ningún procedimiento en el cual, con la ayuda de proteínas precursoras repetitivas, pueda producirse cualquier secuencia de péptidos según un protocolo sencillo, conveniente y que pueda realizarse de modo eficiente.

Diversos péptidos antimicrobianos ya se han descrito en las publicaciones y se han compilado en revisiones (Hancock, R.E.W. y Lehrer, R. 1998 in Trends in Biotechnology, 16: 82-88; Hancock, R.E.W. y Sahl, H.G. 2006 en

Nature Biotechnology, 24: 1551-1557; Lee et al. 2004 en Biotechnology Letters 26: 337-341); también su producción recombinante (Vassilevski et al. 2008 en Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery 2: 58-63).

En las publicaciones se han descrito igualmente péptidos de fusión que reúnen en sí mismos dos péptidos activos. Wade et al. informan sobre el efecto antimicrobiano de diversas fusiones de cecropina A de la polilla de cecropina (Hyalophora cecropina) y del veneno de abeja melitina (Wade, D. et al., 1992, International Journal of Peptide and Protein Research, 40: 429-436). Shin et al. describen el efecto antimicrobiano de un péptido de fusión de cecropina A de la polilla de cecropia y de magainina 2 de la rana de uñas africana (Xenopus laevis), compuesto por 20 aminoácidos. La cecropina A se compone de 37 aminoácidos y muestra actividad contra bacterias gramnegativas, pero una actividad menor contra bacterias grampositivas. La magainina 2 se compone de 23 aminoácidos y es activa contra bacterias, pero también contra líneas de células tumorales. En comparación con la fusión de cecropina A y melitina, esta fusión muestra una actividad hemolítica marcadamente más reducida con un efecto antibacteriano comparable (Shin, S.Y. Kang, J.H., Lee, M.K., Kim, S.Y., Kim, Y., Hahm, K.S., 1998, Biochemistry and Molecular Biology International, 44: 1119-1126). Las solicitudes US 2003/0096745 A1 y US 6,800,727 B2 reivindican esos péptidos de fusión, compuestos por 20 aminoácidos y variantes de esa fusión que, debido al intercambio de aminoácidos, en particular de aminoácidos cargados de forma positiva y aminoácidos hidrófobos, están cargados positivamente con mayor intensidad y son más hidrófobos.

Otros desarrollos de ese péptido de fusión de cecropina-A-magainina 2 son descritos por Shin et al. 1999. En este caso se ha demostrado que el péptido con la SEQ ID NO:6 presentó una actividad hemolítica más reducida en comparación con la fusión inicial, pero no resultó perjudicada la actividad antibacteriana con respecto a Escherichia coli y Bacillus subtilis (Shin et al. 1999 Journal of Peptide Research, 53: 82-90).

Resumen de la invención

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento que pueda aplicarse de forma universal para la producción de péptidos con la ayuda de proteínas precursoras repetitivas.

Dicho objeto se soluciona mediante un principio novedoso para la producción biotecnológica de péptidos, en donde se producen proteínas precursoras repetitivas que contienen una parte elevada de la secuencia de péptidos deseada y contienen las secuencias auxiliares que dominan las propiedades de la proteína precursora de modo predecible. Este procedimiento puede utilizarse para la producción de secuencias de péptidos diferentes, sin tener que establecer nuevamente de forma fundamental las condiciones de expresión de la molécula precursora o el procesamiento subsiguiente, respectivamente para secuencias de péptidos diferentes. Además pueden producirse péptidos en los cuales no son eficientes los métodos utilizados hasta el momento.

Descripción de las figuras

En las figuras que se adjuntan, muestran

Figura 1: una representación de rueda helicoidal de secuencias de aminoácidos, como proyección de una estructura de hélice alfa. La secuencia de aminoácidos A1 - A7 (A) contenida en la proteína precursora repetitiva se representa en un círculo (B). Desde esa disposición se vuelve visible la ubicación de los aminoácidos en una hélice alfa;

Figura 2: el cromatograma de fase inversa del péptido "ZnO" después de la disociación de ácido;

Figura 3: el espectro de masa del péptido "ZnO" después de la disociación de ácido y la fase inversa HPLC; las cifras mostradas indican el valor m/z del respectivo pico monoisotópico;

Figura 4: el cromatograma de fase inversa del péptido "P18" después de la disociación de ácido y la cromatografía de intercambio de cationes;

Figura 5: el espectro de masa del péptido "P18" después de la disociación de ácido, la cromatografía de intercambio de cationes y la fase inversa HPLC; las cifras mostradas indican el valor m/z del respectivo pico monoisotópico;

Figura 6: el cromatograma de fase inversa del péptido "Min" después de la disociación de ácido;

Figura 7: el espectro de masa del péptido "Min" después de la disociación de ácido y la fase inversa HPLC; las cifras mostradas indican el valor m/z del respectivo pico monoisotópico;

Figura 8: el cromatograma de fase inversa del péptido SEQ ID NO:6 después de la disociación de ácido y la cromatografía de intercambio de cationes;

5 Figura 9: el espectro de masa del péptido SEQ ID NO:6 después de la disociación de ácido, la cromatografía de intercambio de cationes y la fase inversa HPLC; las cifras mostradas indican el valor m/z del respectivo pico monoisotópico;

Figura 10: el cromatograma de intercambio de cationes HPLC del péptido "P18" antes y después de la amidación correspondiente al Ejemplo 6; para una comparación está representado el cromatograma de un péptido de referencia sintetizado de forma química y amidado, con la secuencia del péptido "P18" ;

10 Figura 11: el cromatograma de intercambio de cationes HPLC del péptido "P18" antes y después de la amidación correspondiente al Ejemplo 7; para una comparación está representado el cromatograma de un péptido de referencia sintetizado de forma química y amidado, con la secuencia del péptido "P18".

Formas de ejecución preferentes

La presente invención hace referencia en particular a las siguientes formas de ejecución:

15 1. Proteína precursora, en particular una proteína precursora sintética, en particular producida de forma recombinante, que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general

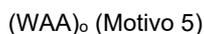


en donde x es >1, donde

20 los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA)), donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:



25 $(GA)_m \text{ (Motivo 2)}$



30 en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6; y los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora, donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente de forma específica, donde las secuencias de escisión comprenden un motivo de secuencia, seleccionado entre NG y DP.

35 2. Proteína precursora que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general



40 en donde x es >1, donde

los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA))

donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:

- 5 A_n (Motivo 1)
 $(GA)_m$ (Motivo 2)
 V_n (Motivo 3)
 $(VA)_m$ (Motivo 4)
 $(WAA)_o$ (Motivo 5)

10 en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6;

y los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora, donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente o enzimáticamente de forma específica, donde

- 15 a) el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada entre las secuencias de aminoácidos catiónicas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 69 a SEQ ID NO: 72, o
- 20 b) el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 29 a 67.

3. Una proteína precursora según una de las formas de ejecución precedentes, en donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros directamente de forma peptídica o mediante una secuencia de péptidos escindible, y el enlace peptídico puede escindirse de forma específica, es decir, exclusivamente o esencialmente en un aminoácido definido o sucesión de aminoácidos de una secuencia.

4. Una proteína precursora según una de las formas de ejecución precedentes, la cual posee propiedades autoensamblantes, de manera que la misma, de manera espontánea, es decir, por sí sola, o de forma inducible, forma productos de asociación estables, no covalentes, los cuales, bajo condiciones estándar, como en particular mediante 0,2 M NaOH dentro de una hora o de 2 M urea o 1 M cloruro de guanidinio, no pueden disolverse respectivamente dentro de 10 min a temperatura ambiente. Si se cumple con al menos uno de los tres criterios mencionados, entonces se encuentra presente un producto de asociación estable según la invención.

5. Una proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un elemento Aux comprende un elemento (SA) de péptido autoensamblante, donde el elemento SA contiene al menos un motivo de secuencia de al menos 8, como por ejemplo 8-10, 8-12, 8-14, 8-16. 8-18 u 8-20 aminoácidos seguidos, el cual contiene al menos 50 %, como por ejemplo 50-100%, 60-90% o 70-80% de radicales de alanina, al menos 50 %, como por ejemplo 50-100%, 60-90% o 70-80% de radicales de valina, o al menos 50 %, como por ejemplo 50-100%, 60-90% o 70-80% de radicales de glutamina, o por lo menos en 80 % se compone de al menos uno de esos radicales. El elemento SA puede contener por ejemplo en particular al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:

- 40 A_n (Motivo 1)
 $(GA)_m$ (Motivo 2)
 V_n (Motivo 3)
 $(VA)_m$ (Motivo 4)
 $(WAA)_o$ (Motivo 5),

donde en particular $n = 8 - 10$, $m = 4 - 8$, y $o=2-4$, como por ejemplo $n = 8 - 9$, $m = 6 - 7$ y $o= 2-3$.

Las secuencias SA pueden alargarse de forma C- terminal y/o N- terminal, en respectivamente 1 a 3 cualquier otro radical de aminoácido deseado. Ejemplos de alargamientos N-terminales adecuados son los motivos de secuencia "G-", "GS-", "GAG-", "GPG-", "GPS-", "GAS-", "GQQ-" y "GSS-". Ejemplos de alargamientos C-terminales adecuados comprenden el motivo de secuencia "-SGP", "-GGA", "-GPG", "-SGA", "-GGQ", "-GGY" y "-GGL".

6. Una proteína precursora según la forma de ejecución 5, en donde el elemento SA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO:73.

7. Una proteína precursora según una de las formas de ejecución precedentes, donde al menos un péptido Aux comprende además un elemento de péptido protector (SU).

8. Una proteína precursora según la forma de ejecución 7, donde el elemento SU presenta una "parte aumentada" de radicales de aminoácido cargados, es decir (por ejemplo en el caso de $pH=7$), una carga total distinta de 0, como por ejemplo de +20 a -20 o de +10 a -10 o de +5 a -5, en particular cargados de forma negativa, como por ejemplo en el caso de $pH=7$, una carga total distinta de cero, como por ejemplo de -1 a -20 en particular de -4 a -10.

9. Una proteína precursora según la forma de ejecución 8, donde el elemento SU en la proteína precursora es capaz de formar una estructura de hélice anfifílica.

10. Una proteína precursora según la forma de ejecución 9, donde el elemento SU es un péptido anfifílico, el cual comprende un segmento de secuencia de al menos siete aminoácidos vinculados mediante péptidos, los cuales son capaces de formar una hélice alfa anfifílica, donde la hélice, en su proyección vertical, presenta una separación de radicales de aminoácidos en una mitad de la hélice hidrófoba y una mitad de la hélice hidrófila, la mitad de la hélice hidrófoba presenta al menos 3, como por ejemplo 3 ó 4, radicales de aminoácidos hidrófobos iguales o distintos contiguos en la proyección vertical, y la mitad de la hélice hidrófila presenta al menos 3, como por ejemplo 3 ó 4, radicales de aminoácidos hidrófilos iguales o distintos contiguos en la proyección vertical.

11. Una proteína precursora según la forma de ejecución 8, 9 ó 10, donde la parte de radicales de aminoácidos cargada del elemento U está seleccionada de manera que la carga neta total de la proteína precursora en el caso de $pH=7$ es mayor que -10 y menor que +10, por ejemplo es mayor que -8 y menor que +8; mayor que -5 y menor que +5, o mayor que -2 y menor que +2.

12. Proteína precursora según una de las formas de ejecución 8 a 11, donde el elemento SU comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 68.

13. Una proteína precursora según una de las formas de ejecución 1 y 3 a 12, donde el elemento Pep comprende una secuencia de péptidos antimicrobiana que presenta una carga total positiva catiónica.

14. Una proteína precursora según la forma de ejecución 13, donde el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos catiónicas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 69 a SEQ ID NO: 72, así como comprende una de las formas de las mismas, indicadas más adelante, modificadas de forma C- terminal y/o de forma N- terminal.

15. Una proteína precursora según una de las formas de ejecución 1 ó 3 a 6, donde el péptido Pep comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 29 a 67, así como comprende una de las formas de las mismas, indicadas más adelante, modificadas de forma C-terminal y/o de forma N- terminal.

16. Una proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes, donde los elementos Aux, independientemente unos de otros, poseen uno de los siguientes significados:

SA,

SA-SU,

SU-SA,

SA-SU-SA,

SU-SA-SU,

en donde los elementos SA y SU están vinculados unos con otros mediante péptidos y los elementos Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos de forma terminal con al menos un elemento Pep, es decir, de forma directa o mediante una secuencia de péptidos escindible, donde al menos el enlace peptídico con respecto a los elementos Pep puede escindirse específicamente de forma química o enzimática.

5 17. Una secuencia de ácido nucleico codificante para al menos una proteína precursora según una de las formas de ejecución precedentes.

18. Una secuencia de ácido nucleico según la forma de ejecución 17, la cual comprende al menos una secuencia codificante según SEQ ID NO: 21, 24; 27; 74 y 76.

10 19. Un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico según la forma de ejecución 17 ó 18, vinculado de forma operativa con al menos una secuencia de ácido nucleico reguladora.

20. Un vector recombinante para la transformación de un huésped eucariota o procariota, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico según una de las formas de ejecución 17 ó 18, o un casete de expresión según la forma de ejecución 19.

21. Un procedimiento para producir un péptido (Pep) deseado, en donde

15 a) se produce una proteína precursora que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general

$(\text{Pep-Aux})_x$ o

$(\text{Aux-Pep})_x$

en donde x es >1 , donde

20 los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA))

donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:

A_n (Motivo 1)

25 $(GA)_m$ (Motivo 2)

V_n (Motivo 3)

$(VA)_m$ (Motivo 4)

$(WAA)_o$ (Motivo 5)

30 en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6;

y los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora, donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente de forma específica;

35 b) los péptidos Pep se escinden desde la proteína precursora; y

40 c) eventualmente, el péptido se modifica de forma enzimática o química, como por ejemplo se amida, esterifica, oxida, alquila o se asocia a otra molécula (por ejemplo mediante ligación química nativa o mediante una adición de Michael); donde por ejemplo el péptido se modifica con una molécula que aumenta la hidrofobicidad del péptido, como por ejemplo se modifica con una molécula que contiene un radical alquilo; donde la modificación puede tener lugar antes o después de una depuración opcional del péptido, tal como se ilustra además mediante los ejemplos que se adjuntan.

- Radicales alquilo adecuados son por ejemplo radicales alquilo C₂-C₁₆, como etilo, i- o n-propilo, n-, i-, butilo secundario o terciario, n- o i- pentilo; además n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, n-undecilo, n-dodecilo, n-tridecilo, n-tetradecilo, n- pentadecilo y n-hexadecilo, así como los análogos ramificados de forma simple o múltiple, así como eventualmente modificaciones sustituidas de los mismos, las cuales portan uno o varios sustituyentes, como por ejemplo de 1, 2 o 3 halógeno (como por ejemplo F, Cl, Br), hidroxilo, mercapto- amino, alquilamino C₁-C₄, o pueden estar sustituidas por uno o varios heteroátomos, como por ejemplo 1, 2 o 3, como O o N, en la cadena de alquilo. Alquilo C₁-C₄ representa en particular metilo, etilo, i- o n- propilo, n-, i-, butilo secundario o terciario.
- 5 22. Un procedimiento según la forma de ejecución 21, donde la proteína precursora se produce en un microorganismo recombinante, el cual porta al menos un vector según la forma de ejecución 20.
- 10 23. Un procedimiento según la forma de ejecución 22, donde la proteína precursora se produce en una cepa recombinante de E. coli.
24. Un procedimiento según una de las formas de ejecución 21 a 23, donde la proteína precursora expresada, después de que eventualmente ha pasado a una forma asociada de forma estable, se purifica y se escinde de forma química o enzimática para la liberación del péptido (Pep) deseado.
- 15 25. Un procedimiento según una de las formas de ejecución 21 a 23, donde se produce una proteína precursora según la forma de ejecución 13 ó 14, como por ejemplo una proteína precursora que contiene módulos de péptido P18 según SEQ ID NO:23 o SEQ ID NO:6..
26. Un procedimiento según la forma de ejecución 25, el cual contiene los siguientes pasos del procesamiento:
- 20 - lavado de los productos de asociación de la proteína precursora con un disolvente que disuelve proteínas contaminantes, pero no los productos de asociación o esencialmente no los disuelve, como por ejemplo 0,1 M a 1,0 M NaOH.
- Escisión de las proteínas precursoras, por ejemplo con un ácido, cuando el péptido deseado, como por ejemplo P18, está fijado en la proteína precursora mediante grupos que pueden escindirse en ácido.
- 25 27. Un procedimiento según la forma de ejecución 26, el cual contiene al menos uno de los siguientes pasos del procesamiento adicionales:
- tratamiento de los productos de asociación de la proteína precursora después de la rotura celular con un medio auxiliar de precipitación, como por ejemplo ácido fosfórico;
- depuración del péptido desde la carga de disociación con un procedimiento cromatográfico;
- lavado del péptido depurado y secado con un disolvente ácido o disolvente o disolvente mezcla.
- 30 28. Un procedimiento según una de las formas de ejecución 20 a 27 para producir el péptido según SEQ ID NO:23, el cual contiene los siguientes pasos del procesamiento:
- tratamiento de los productos de asociación de la proteína precursora después de la rotura celular, mediante la adición de ácido fosfórico al 85 % en peso, hasta que se haya alcanzado pH = 3
- 35 - lavado de los productos de asociación de la proteína precursora con una solución de hidróxido de sodio, como por ejemplo 0,4 M NaOH
- escisión de la proteína precursora con ácido fosfórico o ácido fórmico, como por ejemplo ácido fosfórico al 2 %
- eventualmente lavado del péptido secado con ácido hexanoico o con una mezcla de 99 partes de hexano y una parte de ácido acético
- 40 28. Un procedimiento según una de las formas de ejecución 20 a 27 para producir el péptido según SEQ ID NO:6, el cual contiene los siguientes pasos del procesamiento:
- hidrolizado o bien escisión del pellet, por ejemplo mediante H₃PO₄ al 5 % en peso;
- centrifugación;

- regulación del valor pH del líquido sobrenadante en aproximadamente 4,0; por ejemplo con NaOH al 25 %
- depuración del líquido sobrenadante mediante cromatografía de intercambio de cationes
- precipitación del péptido deseado, por ejemplo mediante la adición de NaOH para el eluato
- centrifugación;
- 5 - resuspensión del pellet en agua
- disolución del péptido, por ejemplo mediante la adición de ácido acético
- liofilización

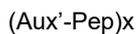
10 29. Un objeto de la descripción hace referencia al péptido P18 (SEQ ID NO:23), así como al péptido SEQ ID NO:6 y a su producción según la invención, así como a su utilización en medios cosméticos o farmacéuticos para el tratamiento o la prevención de descamado, o particular de caspa; o para inhibir el crecimiento y/o la actividad de hongos lipofílicos, en particular *Malassezia ssp.*, como en particular *Malassezia furfur*. Lo mencionado se describe también por ejemplo en la solicitud de patente internacional más antigua PCT/EP2008/010912, fecha de presentación 19 de diciembre de 2008, a cuya descripción se hace referencia aquí de forma expresa.

15 30. Procedimiento según la forma de ejecución 21 ó 22, donde la proteína precursora forma productos de asociación estables que no pueden disolverse mediante 0,2 M NaOH dentro de una hora o mediante 2 M urea o 1 M cloruro de guanidinio dentro de 10 min a temperatura ambiente.

31. Procedimiento según una de las formas de ejecución 21, 22 ó 30, donde la proteína precursora está definida como en una de las formas de ejecución 6 a 16, o se codifica desde una secuencia de ácido nucleico según una de las formas de ejecución 17 y 18.

20 Se describen además en el mismo las siguientes formas de ejecución no acordes a la invención:

32. Una proteína precursora que comprende una secuencia escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux'), de la fórmula general



25 en donde x es >1, donde

los elementos Aux' son iguales o distintos, y comprenden un péptido anfifílico que forma una hélice alfa, donde el péptido anfifílico comprende un segmento de secuencia de por lo menos siete aminoácidos vinculados mediante péptidos, los cuales son capaces de formar una hélice alfa anfifílica,

30 donde la hélice, en su proyección vertical, presenta una separación de radicales de aminoácidos en una mitad de la hélice hidrófoba y una mitad de la hélice hidrófila, la mitad de la hélice hidrófoba presenta al menos 3, como por ejemplo 3 ó 4, radicales de aminoácidos hidrófobos iguales o distintos contiguos en la proyección vertical, y la mitad de la hélice hidrófila presenta al menos 3, como por ejemplo 3 ó 4, radicales de aminoácidos hidrófilos iguales o distintos contiguos en la proyección vertical, y los elementos Pep son iguales o distintos y contienen la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta.

35 32. Una proteína precursora según la forma de ejecución 31, donde los elementos Aux' comprenden al menos un elemento de péptido (SA) autoensamblante según la definición en una de las formas de ejecución 4 y 5.

33. Proteína precursora según la forma de ejecución 31 ó 32, donde el péptido (Pep) deseado es un péptido antimicrobiano catiónico y el elemento Aux' es un péptido aniónico, que forma una hélice alfa anfifílica.

40 34. Utilización de un péptido anfifílico como péptido protector para la producción recombinante de un péptido deseado antimicrobiano, distinto del mismo; donde el péptido anfifílico comprende un segmento de secuencia de al menos siete aminoácidos vinculados mediante péptidos, los cuales son capaces de formar una hélice alfa anfifílica,

donde la hélice, en su proyección vertical, presenta una separación de radicales de aminoácidos en una mitad de la hélice hidrófoba y una mitad de la hélice hidrófila, la mitad de la hélice hidrófoba presenta al menos 3 radicales de aminoácidos hidrófobos iguales o distintos contiguos (en la proyección vertical), y la mitad de la hélice hidrófila presenta al menos 3 radicales de aminoácidos hidrófilos iguales o distintos contiguos (en la proyección vertical).

- 5 35. Utilización según la forma de ejecución 34, donde el péptido (Pep) deseado es un péptido antimicrobiano catiónico y el elemento Aux' es un péptido aniónico, que forma una hélice alfa anfifílica.

Descripción detallada de aspectos individuales de la invención

1. Péptidos

- 10 Los péptidos (Pep) según la presente invención, los cuales pueden denominarse también como "péptidos deseados" o "péptidos-diana", son cadenas de aminoácidos en los cuales 5 a 70 y en particular 7 a 50, como por ejemplo 10 a 40, 12 a 35 o 15 a 25 aminoácidos están vinculados mediante enlaces peptídicos. Los péptidos pueden estar estructurados a partir de cualquier aminoácido α , en particular a partir de aminoácidos proteínogénicos.

- 15 Los péptidos pueden poseer determinadas propiedades biológicas o químicas deseadas, así como en particular también propiedades que pueden utilizarse farmacológicamente. Ejemplos de propiedades de esa clase son: actividad antimicrobiana, fijación específica en determinadas superficies, propiedades de nucleación en procesos de cristalización y formación de partículas, control de estructuras de cristal, fijación de metales o iones de metal, propiedades activas en la superficie, propiedades emulgentes, propiedades estabilizantes de espuma, influencia de la adsorción celular.

Los péptidos pueden presentar una o varias de esas propiedades.

- 20 Se describe igualmente aquí un método para la producción de péptidos antimicrobianos. Los "péptidos antimicrobianos" de esa clase están caracterizados porque en presencia de concentraciones $\leq 100 \mu\text{M}$ del péptido antimicrobiano se inhiben el crecimiento y/o la multiplicación de al menos una clase de bacterias grampositivas o gramnegativas y/o de al menos una clase de levaduras y/o de al menos una clase de hongos filamentosos y/o de al menos una clase de algas, y/o se eliminan las células del organismo correspondiente.

- 25 Se describe aquí igualmente la puesta a disposición de péptidos antimicrobianos catiónicos. Los péptidos antimicrobianos catiónicos están caracterizados porque los mismos presentan un efecto antimicrobiano según la definición antes indicada, así como una carga neta, en el caso de pH7, mayor que 0.

Los péptidos catiónicos de esa clase contienen por ejemplo la siguiente secuencia:

$X_1 X_2 K X_3 X_4 X_5 KIP X_{10} KFX_6 X_7 X_8 AX_9 KF$ (SEQ ID NO: 7)

- 30 en donde

X_{10} representa un enlace peptídico o uno o dos radicales de aminoácido cualquiera, básicos o hidrófobos, o uno o dos radicales de prolina, y

X_1 a X_9 significan cualquier radical de aminoácido básico o hidrófobo, distinto de prolina;

y/o mutantes o derivados de los mismos;

- 35 donde los motivos de secuencia repetitivos contenidos en la proteína precursora pueden ser iguales o distintos.

En otra forma de ejecución preferente, la presente invención hace referencia a la producción de péptidos que contienen la siguiente secuencia:

$X_1 X_2 K X_3 X_4 X_5 KIP X_{11} X_{12} KFX_6 X_7 X_8 AX_9 KF$ (SEQ ID NO: 8)

- 40 en donde

X_1 representa lisina, arginina o fenilalanina,

X_2 representa lisina o triptófano,

X₃ representa leucina o lisina,

X₄ representa fenilalanina o leucina,

X₅ representa leucina o lisina,

X₆ representa leucina o lisina,

5 X₇ representa histidina o lisina,

X₈ representa alanina, leucina, valina o serina,

X₉ representa leucina o lisina,

X₁₁ representa prolina o un enlace químico, y

X₁₂ representa prolina o un enlace químico,

10 y/o mutantes o derivados de los mismos;

donde los motivos de secuencia repetitivos contenidos en la proteína precursora son iguales o distintos;

Ejemplos no limitativos de las secuencias anteriores o motivos de secuencias repetitivos son SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 – SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71, y/o mutantes o derivadas de las mismas.

15 Otros péptidos adecuados están descritos por ejemplo en la solicitud de patente internacional de la presente solicitante de patente PCT/EP2008/010912, fecha de presentación 19/12/2008, a la cual se hace referencia aquí de forma expresa.

2. Proteínas precursoras repetitivas

20 Las proteínas precursoras repetitivas según la presente invención están caracterizadas porque al menos 60 %, en particular al menos 80 % de su secuencia de aminoácidos, como por ejemplo 60- 99%, 70-95%, 75-85%, respectivamente referido a la longitud de la secuencia total, se componen de unidades de repetición peptídicas (como se define más adelante). La parte restante puede comprender por ejemplo péptidos no-repetitivos, como por ejemplo péptidos de señal, tags y similares.

3. Unidades de repetición

25 Las unidades de repetición peptídicas contienen al menos un péptido que se produce de forma ventajosa según la presente invención, y que en principio están estructuradas del siguiente modo

(Pep-Aux)_x o

(Aux-Pep)_x

en donde x es >1, y donde Pep representa el péptido antes indicado y Aux está definido como en la reivindicación 1.

30 Una unidad de repetición (Pep-Aux, así como Aux-Pep) según la presente invención es una secuencia de aminoácidos con una longitud de 10-200, como por ejemplo 20-130 y o 30-80 aminoácidos que dentro de una proteína precursora está contenida varias veces como secuencia idéntica o como variación de una secuencia determinada con al menos 70 %, como por ejemplo con al menos 80 % y en particular aproximadamente al menos 90 % de identidad, como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad. Las proteínas precursoras repetitivas según la presente invención, con ello, pueden contener por ejemplo copias idénticas o variaciones de una única o de 35 varias secuencias de aminoácidos diferentes, como por ejemplo del módulo Pep y/o del módulo Aux.

En una proteína precursora repetitiva, además, un número cualquiera de las unidades de repetición anteriores pueden estar reunidas unas con otras, como por ejemplo >1-100, >1-50, ó 2-32 y en particular 4-16.

La parte del péptido según la invención en la unidad de repetición, referido a la masa molar, asciende a 20%-80%, como por ejemplo a 30%-70% o de 40 a 60%. La parte restante de la unidad de repetición es ocupada por las

secuencias Aux, en particular por las secuencias SA y Su antes definidas, así como eventualmente por secuencias de escisión específicas, para la separación selectiva del módulo Pep.

4. Secuencias auxiliares

5 Las secuencias auxiliares, en el sentido más amplio, son secuencias de aminoácidos en una proteína precursora según la invención, las cuales influyen las propiedades de la proteína precursora de modo que se mejoran la expresión, la estabilidad y/o el procesamiento de la proteína precursora. Las secuencias auxiliares, en una proteína precursora, pueden formar parte de una unidad de repetición (los módulos Aux antes indicados) o pueden estar unidas a la proteína precursora de forma aminoterminal o carboxiterminal, como por ejemplo 6 x His-Tag (HHHHHH), T7-Tag (MASMTGGQMG), S-Tag (KETAAKFERQHMS), c-Myc-Tag (EQKLISEEDL), Strep-Tag (WSHPQFEK) o HA-Tag (YPYDVPDYA), glutatión S-transferasa, proteína de unión de maltosa, proteína de unión de celulosa. Estas y otras secuencias auxiliares están descritas en Terpe; Appl Microbiol Biotechnol; 60(5): 523-33 (2003). Además, las secuencias auxiliares son adecuadas para ser unidas a la proteína precursora de forma aminoterminal o carboxiterminal CanA (Mai, "In Vitro Untersuchungen zum extrazellulären Netzwerk von Pyrodictium abyssii TAG11" disertación, Universidad de Regensburg (1998)) y yaaD (Wohlleben Eur Biophys J, (2009) publicación en línea).

En una forma de ejecución, la proteína precursora contiene secuencias auxiliares que influyen la solubilidad de la proteína precursora.

20 Las secuencias auxiliares otorgan propiedades "autoensamblantes" a la proteína precursora. Las propiedades autoensamblantes de la proteína precursora están caracterizadas porque la proteína precursora, ya durante la expresión, de manera "espontánea", es decir, por sí sola, sin una medida requerida de forma adicional, forma productos de asociación estables, o la formación de esos productos de asociación estables desde proteínas precursoras solubles "puede ser inducida", es decir, puede ser iniciada por un iniciador. Las proteínas precursoras que presentan las propiedades autoensamblantes, en comparación con otras proteínas precursoras, ofrecen la ventaja de que las mismas pueden ser depuradas de forma sencilla y eficiente. Los productos de asociación de esa clase, en general de forma exclusiva o esencialmente, comprenden la formación de enlaces no-covalentes, como por ejemplo puentes de oxígeno, interacciones iónicas y/o hidrófobas.

30 Las secuencias autoensamblantes presentan una longitud de al menos 8 aminoácidos seguidos. Las secuencias adecuadas pueden localizarse por ejemplo en una proteína conocida en sí misma, la cual ya ha demostrado el ensamblaje formando productos de asociación de mayor peso molecular. Son ejemplos de productos de asociación de esa clase las fibrillas amiloides, filamentos de actina o de miosina, fibras de proteína como fibras de elastina, fibras de colágeno, filamentos de biso de moluscos, fibras de queratina o hilos de seda. Estas y otras proteínas que contienen secuencias autoensamblantes están descritas en Scheibel, Current Opinion in Biotechnology 16; 1-7 (2005), a lo cual se hace referencia aquí de forma expresa.

35 Como "iniciadores" pueden utilizarse soluciones de sales cosmotrópicas. A modo de ejemplo pueden mencionarse sales cosmotrópicas que contienen al menos una clase de iones, la cual, en correspondencia con la así llamada Serie de Hofmeister, presenta propiedades cosmotrópicas más intensas que los iones de sodio o de cloruro. Ejemplos de esas sales son el fosfato de potasio y el sulfato de amonio. Ejemplos de soluciones salinas de esa clase son fosfato de potasio 0,5 M o sulfato de amonio 0,8 M.

40 Los productos de asociación estables según la invención, de proteínas precursoras, se caracterizan porque los mismos, durante el tratamiento con soluciones que habitualmente pueden solubilizarse una pluralidad de proteínas agregadas, mantienen su forma asociada por un tiempo determinado y, de ese modo, pueden separarse de impurezas de proteínas. Ejemplos de soluciones de esa clase son soluciones de bases ácidos, urea, sales y detergentes. En particular, los productos de asociación estables según la invención, en un tiempo determinado, son insolubles en soluciones de hidróxidos alcalinos, urea, sales de guanidinio o detergentes cargados, como por ejemplo sales de alquil trimetil amonio o sulfatos de alquilo.

50 En particular, los productos de asociación estables, por un tiempo determinado, son insolubles en $\geq 0,2$ M hidróxido de sodio, ≥ 2 M urea, ≥ 1 M hidrocloreto de guanidinio, ≥ 1 M tiocianato de guanidinio o $\geq 0,1\%$ dodecilsulfato de sodio o $\geq 0,1\%$ bromuro de cetil trimetil amonio. En particular, los productos de asociación estables de proteínas precursoras en las soluciones mencionadas son estables por ≥ 10 min, como por ejemplo por ≥ 30 min y en particular por ≥ 60 min.

Un producto de asociación se presenta en particular cuando el mismo no puede disolverse

- a) mediante 0,2 M NaOH dentro de una hora y/o
- b) de 2 M urea y/o

c) de 1 M hidrocloreuro de guanidinio

dentro de 10 min a temperatura ambiente (en general aproximadamente 20 °C).

En otra forma de ejecución especial, la proteína precursora contiene secuencias auxiliares (SU) que protegen a la célula huésped de influencias nocivas de la proteína precursora repetitiva.

- 5 En una forma de ejecución especial, la proteína precursora contiene secuencias auxiliares SU que protegen a la célula huésped de influencias nocivas de secuencias de péptidos antimicrobianas catiónicas que están contenidas en la proteína precursora repetitiva. En particular, esas secuencias de protección contienen aminoácidos cargados de forma negativa (Asp, Glu). En particular, la secuencia auxiliar contiene un número de aminoácidos cargados de forma negativa, glutamato y/o aspartato, de manera que la carga neta total, en el caso de pH=7, dentro de la proteína precursora repetitiva, es mayor que -10 y menor que +10, ante todo mayor que -5 y menor que +5, como por ejemplo mayor que -2 y menor que +2.

- 15 En otra forma de ejecución especial, la secuencia de protección cargada de forma negativa forma una hélice anfífilica. Una hélice anfífilica según la presente invención se forma entonces cuando, en la disposición circular (es decir, en su proyección axial (a lo largo del eje de la hélice), o vista superior), de una secuencia de 7 aminoácidos (A1 - A7) consecutivos en la estructura primaria, en el siguiente orden: A1 - A5 - A2 - A6 - A3 - A7 - A4 (Figura 1) al menos 3 en aminoácidos que se sitúan en el círculo unos junto a otros, son aminoácidos hidrófobos (Ala, Met, Cys, Phe, Leu, Val, Ile) o glicina, y 3 aminoácidos que se sitúan unos junto a otros en el círculo, son aminoácidos hidrófilos (Thr, Ser, Trp, Tyr, Pro, His, Glu, Gln, Asp, Asn, Lys, Arg) o glicina. Esa disposición circular se denomina también como "helical wheel projection" (proyección de rueda helicoidal).

- 20 En una forma de ejecución preferente, la secuencia de protección cargada de forma negativa corresponde a una de las secuencias SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 19

5. Secuencias de escisión

- 25 Las secuencias de escisión son secuencias de aminoácidos que están dispuestas antes y después de las secuencias de péptidos (Pep) deseadas según la invención. Esas secuencias posibilitan la escisión "específica" de los módulos Pep, desde la proteína precursora repetitiva. "Específico", en este contexto, significa que la escisión tiene lugar en la proteína precursora, esencialmente, en particular exclusivamente, en una o en varias posiciones definidas, debido a lo cual se separa el péptido deseado o un precursor del mismo.

- 30 Un "precursor" puede encontrarse presente por ejemplo de manera que en uno o en ambos extremos de la cadena peptídica están contenidos radicales de aminoácidos que no forman parte de la secuencia de péptidos nativa, original, cuya utilización posterior y funcionalidad sin embargo no interfieren o, en caso necesario, pueden escindirse con métodos químicos o bioquímicos convencionales.

- 35 Las secuencias de escisión pueden actuar como secuencia de detección específica para enzimas proteolíticamente activas, que se fijan en esa secuencia y escinden el enlace peptídico entre dos aminoácidos determinados. Son ejemplos secuencias de detección para Arg-C proteinasa, Asp-N-Endopeptidasa, caspasa, quimotripsina, clostripain, enteroquinasa, factor Xa, glutamil endopeptidasa, granzima B, LysC lisilendopeptidasa (Achromobacter proteinasa I), LysN peptidil- Lis metalloendopeptidasa, pepsina, prolina, endopeptidasa, proteinasa K, peptidasa I estafilococal, termolisina, trombina, tripsina. Las secuencias de detección correspondientes están descritas en las publicaciones, por ejemplo en Keil, "Specificity of proteolysis" página 335, editorial Springer-Verlag (1992).

- 40 De manera alternativa, secuencias de aminoácidos determinadas posibilitan la escisión selectiva del grado de presión del polipéptido con químicos determinados, como por ejemplo BNPS-escatol (2-(2'-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3-bromoinolenina), bromuro de cianógeno, ácidos, hidroxilamina, ácido yodobenzoico, NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico).

- 45 En particular, las secuencias de escisión utilizadas posibilitan la escisión de las proteínas precursoras repetitivas con sustancias químicas. Las secuencias de escisión especialmente adecuadas comprenden los motivos de secuencia Asn-Gly, una escisión con hidroxilamina o Asp-Pro o Asp-Xxx que permite una escisión con ácido, donde Xxx representa cualquier aminoácido proteínogeno.

6. Otras variantes de secuencias según la invención

6.1 Secuencias de aminoácidos

Junto con las secuencias para péptidos (Pep) descritas aquí en concreto, y secuencias auxiliares (Aux, SA, SU), secuencias repetitivas, secuencias de escisión y secuencias para proteínas precursoras repetitivas, son objeto de la invención también equivalentes funcionales, derivados funcionales y sales de esa secuencia.

5 Como "equivalentes funcionales", según la invención se entienden en particular también mutantes que en al menos una posición de secuencia, de las secuencias de aminoácidos antes mencionadas, presentan un aminoácido diferente al mencionado de forma concreta, pero que a pesar de ello poseen las mismas propiedades de los péptidos no modificados de forma original. De este modo, los "equivalentes funcionales", comprenden los mutantes que se obtienen mediante una o varias adiciones, sustituciones, deleciones y/o inversiones de aminoácidos, donde
10 las modificaciones mencionadas pueden presentarse en cualquier posición de la secuencia, en tanto conduzcan a un mutante con el perfil de propiedades según la invención. La equivalencia funcional se da también en particular cuando los patrones de reactividad entre mutantes y polipéptido no modificado coinciden de forma cualitativa.

Los "equivalentes funcionales", en el sentido anterior, son también "precursores" de los polipéptidos descritos, así como "derivados funcionales" y "sales" de los polipéptidos.

15 Los "precursores" son precursores naturales o sintéticos de los polipéptidos, con o sin la actividad biológica deseada.

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos adecuadas pueden apreciarse en la siguiente tabla:

| Radical original | Ejemplos de la sustitución |
|------------------|----------------------------|
| Ala | Ser |
| Arg | Lys |
| Asn | Gln; His |
| Asp | Glu |
| Cys | Ser |
| Gln | Asn |
| Glu | Asp |
| Gly | Pro |
| His | Asn ; Gln |
| Ile | Leu; Val |
| Leu | Ile; Val |
| Lys | Arg ; Gln ; Glu |
| Met | Leu ; Ile |
| Phe | Met; Leu ; Tyr |
| Ser | Thr |
| Thr | Ser |
| Trp | Tyr |
| Tyr | Trp ; Phe |
| Val | Ile; Leu |

5 Como la expresión "sales" se entienden tanto sales de grupos carboxilo, como también sales de adición de ácidos de grupos amino de las moléculas de péptido según la invención. Las sales de grupos carboxilo pueden producirse de modo conocido y comprenden sales inorgánicas, como por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, hierro y cinc, así como sales con bases orgánicas, como por ejemplo aminas, como trietanolamina, arginina, lisina, piperidina y similares. Las sales de adición de ácido, como por ejemplo sales con ácidos minerales, como ácido clorhídrico y sales con ácidos orgánicos, como ácido acético y ácido oxálico, son igualmente objeto de la invención.

10 Los "derivados funcionales" (o "derivados") de los polipéptidos según la invención, en grupos laterales de aminoácidos funcionales o en su extremo N-terminal o C-terminal, pueden producirse igualmente con la ayuda de técnicas conocidas. Los derivados de esa clase comprenden por ejemplo ésteres alifáticos de grupos carboxílicos, amidas de grupos carboxílicos, que pueden obtenerse mediante la reacción de amoniaco o con una amina primaria o secundaria; N-acilderivados de grupos amino libres, producidos mediante la reacción con grupos acilo; o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres, producidos mediante la reacción con grupos acilo. Además, de forma N-terminal y/o C-terminal, de manera adicional, pueden estar unidos (peptídicamente) de forma covalente de 1 a 5, como por
15 ejemplo 2, 3 ó 4 radicales de aminoácidos D o L deseados.

6.2 Ácidos nucleicos, constructos de expresión, vectores y microorganismos que contienen los mismos

Ácidos nucleicos:

La invención comprende además las moléculas de ácido nucleico codificantes para el péptido y las secuencias de proteína utilizados según la invención.

20 Todas las secuencias de ácido nucleico mencionadas aquí (secuencias de ADN y de ARN de una sola hebra y de doble hebra, como por ejemplo ADNc y ARNm, de manera conocida, pueden producirse mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de módulos de ácido nucleico que se superponen, complementarios, de hélice doble. La síntesis química de oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de manera conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, segunda edición, Wiley Press
25 New York, páginas 896-897). La fijación de oligonucleótidos sintéticos y del llenado de espacios con la ayuda del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa y reacciones de ligación, así como procedimientos de clonación generales, se describen en Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

30 La invención hace referencia a moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos o proteínas, o secciones biológicamente activas de los mismos. Están descritos también en este caso fragmentos de ácido nucleico que pueden utilizarse por ejemplo como sondas de hibridación o como activadores para la identificación o amplificación de ácidos nucleicos codificantes según la invención.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden contener además secuencias no traducidas del extremo 3' y/o 5' del área del gen codificante.

35 Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están agregadas en la fuente natural del ácido nucleico, y además esencialmente puede estar libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o puede estar libre de precursores químicos o de sustancias químicas separadas cuando se sintetiza de forma química.

40 Una molécula de ácido nucleico según la invención puede aislarse mediante técnicas estándar de biología molecular y puede aislarse la información de secuencia proporcionada según la invención. Por ejemplo, ADNc puede aislarse desde un banco de ADNc adecuado, utilizando una de las secuencias completas descritas concretamente o una sección de las mismas, como sonda de hibridización y técnicas de hibridización estándar (como se describe por ejemplo en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, edición 2. , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, mediante
45 reacción de cadenas de polimerasa puede aislarse una molécula de ácido nucleico que comprende una de las secuencias descritas o una sección de las mismas. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector adecuado y caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos según la invención pueden producirse mediante procedimientos de síntesis estándar, por ejemplo con un aparato de síntesis de ADN automático.

50 La descripción comprende además las moléculas de ácido nucleico complementarias con respecto a las secuencias de nucleótidos descritas de forma concreta, o una sección de las mismas.

Las secuencias de nucleótidos según la invención posibilitan la producción de sondas e iniciadores que pueden utilizarse para la identificación y/o la clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y organismos. Las sondas de esa clase o iniciadores habitualmente comprenden un área de secuencia de nucleótidos que, bajo condiciones rigurosas, se hibridiza en al menos aproximadamente, de manera preferente aproximadamente 25, como por ejemplo 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de una cadena de sentido de una secuencia de ácido nucleico según la invención o de una cadena antisentido correspondiente.

Según la invención, están comprendidas también aquellas secuencias de ácido nucleico que comprenden así llamadas mutaciones mudas o que, en correspondencia con el uso de codones de un organismo especial original o huésped, están modificadas en comparación con una secuencia mencionada en concreto, al igual que variantes que se presentan de forma natural, como por ejemplo variantes de corte y empalme o variantes de alelos de las mismas. Del mismo modo están descritas secuencias que se obtienen mediante sustituciones de nucleótidos conservativas (es decir que el aminoácido correspondiente se reemplaza por un aminoácido de la misma carga, tamaño, polaridad y/o solubilidad).

Son objeto de la descripción también las moléculas derivadas de los ácidos nucleicos descritos de forma concreta, mediante polimorfismos de secuencia. Esos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población, debido a la variación natural. Esas variaciones naturales habitualmente provocan una varianza de 1 a 5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen.

Además, la descripción comprende también secuencias de ácido nucleico que hibridizan con las secuencias codificantes antes mencionadas o que son complementarias con respecto a ello. Esos nucleótidos pueden encontrarse en la selección de bancos genómicos o bancos de ADNc, y eventualmente, en base a ello, pueden multiplicarse con iniciadores adecuados mediante PCR, y a continuación pueden aislarse, por ejemplo con sondas adecuadas. Otra posibilidad ofrece la transformación de microorganismos adecuados con polinucleótidos según la invención o vectores, la multiplicación de los microorganismos y, con ello, de los polinucleótidos, y su aislamiento subsiguiente. Además, los polinucleótidos según la invención pueden sintetizarse también por vías químicas. Como la propiedad de poder "hibridizar" en polinucleótidos se entiende la capacidad de un polinucleótido u oligonucleótido, bajo condiciones rigurosas, de unirse a una secuencia casi complementaria, mientras bajo esas condiciones no se realizan enlaces no específicos entre parejas no complementarias. Para ello, las secuencias tienen que ser complementarias en 70-100 %, preferentemente en 90-100 %. La propiedad de secuencias complementarias, de poder unirse específicamente unas con otras, se aprovecha por ejemplo en la técnica de transferencia de Northern o Southern, o en la unión de iniciadores en PCR o RT-PCR. Habitualmente se utilizan oligonucleótidos a partir de una longitud de 30 pares de bases. Como condiciones rigurosas, por ejemplo en la técnica de transferencia de Northern, se entiende la utilización de una solución de lavado caliente a 50-70 °C, preferentemente a 60-65 °C, por ejemplo 0,1 x SSC-tampón con 0,1 % SDS (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M citrato de Na, pH 7,0) para la elución de sondas de ADNc hibridizadas de forma no específica u oligonucleótidos. De este modo, como se ha mencionado anteriormente, sólo los ácidos nucleicos complementarios en un grado elevado permanecen unidos unos con otros. La regulación de las condiciones rigurosas es conocida por el experto y está descrita por ejemplo en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

Como la "identidad" entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos sobre la respectiva totalidad del ácido nucleico, en particular la identidad que se calcula mediante comparación con la ayuda del vector NTI Suite 7.1, software de la firma Informax (USA), mediante la aplicación del método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. *Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci.* 1989 abril;5(2):151-1), mediante la regulación de los siguientes parámetros:

Parámetros de alineamiento múltiple:

| | |
|--|---------|
| Penalización de apertura de gap | 10 |
| Penalización de extensión de gap | 10 |
| Rango de penalización de separación de gap | 8 |
| Penalización de separación de gap | cerrado |
| % identidad para retraso de alineamiento | 40 |
| Gaps específicos de residuo | cerrado |
| Gap de residuo hidrofílico | cerrado |

Peso de transición 0

Parámetros de alineamiento en pares:

| | |
|-------------------------------------|---|
| Algoritmo FAST en tamaño de K-tupla | 1 |
| Penalización de gap | 3 |
| Tamaño de ventana | 5 |
| Número de mejores diagonales | 5 |

5 Constructos de expresión y vectores:

Además, son objeto de la invención los constructos de expresión que, bajo el control genético de secuencias de ácidos nucleicos regulatorias, contienen una secuencia de ácidos nucleicos codificante para una proteína precursora según la invención, así como vectores que comprenden al menos uno de esos constructos de expresión. Preferentemente, los constructos de esa clase, según la invención, 5' aguas arriba de la respectiva secuencia codificante, comprenden un promotor y 3' aguas abajo, una secuencia de terminador, así como eventualmente otros elementos regulatorios habituales, a saber, respectivamente asociados de forma operativa a la secuencia codificante, terminador y eventualmente otros elementos regulatorios, de manera que cada uno de los elementos regulatorios puede cumplir su función en la expresión de la secuencia codificante, de acuerdo con lo previsto. Ejemplos de secuencias que pueden asociarse de forma operativa son secuencias de targeting, así como potenciadores, señales de poliadenilación y similares. Otros elementos regulatorios comprenden marcadores seleccionables, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Secuencias regulatorias adecuadas están descritas por ejemplo en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

20 Adicionalmente con respecto a las secuencias de regulación artificiales puede estar presente además la secuencia regulatoria natural antes de la estructura del gen propiamente dicha. Mediante la variación genética eventualmente puede eliminarse esa regulación natural y la expresión de los genes puede aumentarse o reducirse. No obstante, el constructo del gen también puede estar estructurado de forma más sencilla, es decir, que no se insertan señales de regulación adicionales antes de la estructura del gen y no se elimina el promotor natural con su regulación. En lugar de ello, la secuencia de regulación natural muta de manera que ya no tiene lugar una regulación y se incrementa o se reduce la expresión del gen. Las secuencias de ácido nucleico pueden estar contenidas en una o en varias copias en el constructo del gen.

30 Ejemplos de promotores utilizables son: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpplac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- o promotor en lambda-PL, los cuales ventajosamente se emplean en bacterias gramnegativas; así como los promotores grampositivos amy y SPO2, los promotores de levadura ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH o los promotores vegetales CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not o el promotor de ubiquitina o de faseolina. Se considera especialmente preferente la utilización de promotores inducibles, como por ejemplo promotores inducibles por luz y en particular inducibles por temperatura, como el promotor P_rPi. En principio pueden utilizarse todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación. Además, de manera ventajosa, pueden utilizarse también promotores sintéticos.

Las secuencias regulatorias mencionadas tienen que posibilitar la expresión buscada de las secuencias de ácido nucleico y de la expresión de proteínas. Dependiendo del organismo huésped, esto puede significar que el gen primero se expresa o sobreexpresa después de la inducción, o que se expresa y/o sobreexpresa de forma inmediata.

40 Las secuencias regulatorias o factores, preferentemente, pueden de este modo influenciar positivamente la expresión y, debido a ello, aumentarla o reducirla. De este modo puede tener lugar un refuerzo de los elementos regulatorios, de manera ventajosa, en el plano de la transcripción, mediante la utilización de señales de transcripción intensas, como promotores y/o "potenciadores". Asimismo, sin embargo, es posible también un refuerzo de la traducción, mejorando por ejemplo la estabilidad del ARNm.

La producción de un casete de expresión tiene lugar mediante la fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos codificante adecuada, así como con una señal de terminador o de poliadenilación. Para ello se utilizan técnicas de recombinación y clonación corrientes, como están descritas por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), así como en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. And Wiley Interscience (1987).

La estructura del ácido nucleico recombinante o bien el constructo del gen en un organismo huésped adecuado, de manera ventajosa, se inserta en un vector específico del huésped, el cual posibilita una expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores son bien conocidos por el experto y pueden encontrarse por ejemplo en *Cloning Vectors*" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Como vectores, además de plasmidas, pueden entenderse también todos los otros vectores conocidos por el experto, como por ejemplo fagos, virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos de inserción, fásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular.

Esos vectores pueden replicarse de forma autónoma en el organismo huésped o pueden replicarse de forma cromosómica.

Como ejemplos de vectores de expresión adecuados pueden mencionarse:

Vectores de expresión de fusión habituales, como pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), en los cuales glutatión S-transferasa (GST), proteína ligante de maltosa o proteína A, se fusiona en la proteína diana recombinante.

Los vectores de expresión de proteína de no - fusión, como pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89).

Vector de expresión de levadura para la expresión en la levadura *S. cerevisiae*, como pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123) así como pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vectores y procedimientos para la construcción de vectores que son adecuados para la utilización en otros hongos, como hongos filamentosos, comprenden aquellos que están descritos en detalle en: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Vectores de baculovirus que están disponibles para la expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo células Sf9), comprenden la serie pAc (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, (1989) *Virology* 170:31-39).

Vectores de expresión de vegetales, como aquellos que están descritos en detalle en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. y Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721.

Vectores de expresión de mamíferos, como pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195).

Otros sistemas de expresión adecuados para células procariontas y eucariotas están descritos en los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Microorganismos recombinantes:

Con la ayuda de los vectores según la invención pueden producirse microorganismos recombinantes que por ejemplo están transformados con al menos un vector según la invención y que pueden utilizarse para la producción de los polipéptidos según la invención. De manera ventajosa, los constructos recombinantes antes descritos según la invención se introducen en un sistema huésped adecuado y se expresan. De este modo, se utilizan preferentemente métodos de clonación y de transfección corrientes conocidos por el experto, como por ejemplo co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares, para alcanzar la expresión de los ácidos nucleicos mencionados en el respectivo sistema de expresión. Sistemas adecuados están descritos por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, o

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, edición 2. , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5 Según la invención también pueden producirse microorganismos recombinantes de forma homóloga. Para ello se produce un vector que contiene al menos un segmento de un gen según la invención o de una secuencia codificante, en donde eventualmente ha sido introducida al menos una delección, adición o sustitución de aminoácidos, para modificar la secuencia según la invención, por ejemplo para disrumpirla de forma funcional (vector "knockout"). La secuencia introducida por ejemplo puede ser también un homólogo proveniente de un microorganismo emparentado o puede estar derivado desde una fuente de un mamífero, de una levadura o de un insecto. El vector utilizado para la recombinación homóloga, de manera alternativa, puede estar configurado de manera que el gen endógeno está mutado o modificado de otro modo en la recombinación homóloga, pero aún codifica la proteína funcional (por ejemplo el área regulatoria situada aguas arriba puede estar modificada de manera que debido a ello se modifica la expresión de la proteína endógena). La sección modificada del gen según la invención está en el vector de recombinación homólogo. La construcción de vectores adecuados para la recombinación homóloga está descrita por ejemplo en Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51:503.

15 Como organismos huésped en principio son adecuados todos los organismos que posibilitan una expresión de los ácidos nucleicos según la invención, de sus variantes de alelos, de sus equivalentes funcionales o derivados. Como organismos huésped se entienden en particular bacterias, hongos, levaduras, células vegetales o animales.

20 Ejemplos no limitativos para organismos de expresión procariontes son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum*, entre otros. Ejemplos no limitativos para organismos de expresión eucariotas son levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, entre otros, hongos filamentosos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum*, entre otros, células de mamíferos, como células HeLa, células COS, células CHO, entre otras, células de insectos, como células Sf9, células MEL, entre otras, vegetales o células de vegetales como *Solanum tuberosum*, *Nicotiana*, entre otras.

25 La selección de organismos transformados de forma exitosa puede tener lugar mediante genes marcadores que igualmente están contenidos en el vector o en el casete de expresión. Ejemplos de genes marcadores de esa clase son genes para la resistencia a antibióticos y para enzimas que catalizan una reacción que otorga un color, la cual provoca una coloración de la célula transformada. Éstos pueden entonces seleccionarse mediante una clasificación automática de las células. Los microorganismos transformados de forma exitosa con un vector, los cuales portan un gen de resistencia a antibióticos correspondiente (por ejemplo G418 o higromicina, pueden seleccionarse mediante medios o que contienen antibióticos correspondientes o medios de cultivo. Las proteínas marcadoras que se presentan en la superficie de la célula pueden usarse para la selección mediante cromatografía de afinidad.

7. Producción recombinante de las proteínas precursoras y péptidos

35 Los péptidos y proteínas precursoras utilizados según la invención en principio pueden producirse de forma recombinante de manera conocida, donde se cultiva un microorganismo que produce un péptido/proteína precursora, eventualmente se induce la expresión de los polipéptidos y la misma se aísla desde el cultivo. De este modo, los péptidos y las proteínas precursoras pueden producirse también a gran escala, en caso de que eso sea deseable.

40 El microorganismo recombinante puede cultivarse y fermentarse según procedimientos conocidos. Las bacterias pueden multiplicarse por ejemplo en medio TB o LB, a una temperatura de 20 a 40°C, y a un valor pH de 6 a 9. Las condiciones de cultivo adecuadas se describen en detalle por ejemplo en T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

45 Las células, en caso de que los péptidos o las proteínas precursoras no secreten en el medio de cultivo, se maceran y el producto se obtiene desde el lisado según procedimientos conocidos para el aislamiento de proteínas. De manera opcional, las células pueden macerarse mediante ultrasonido de alta frecuencia, mediante presión elevada, como por ejemplo en una célula de presión francesa, mediante osmólisis, mediante el efecto de detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, mediante homogeneizadores o mediante la combinación de varios de los procedimientos mencionados.

50 Una depuración de los péptidos o proteínas precursoras puede lograrse con procedimientos de cromatografía conocidos, como cromatografía con tamiz molecular (filtración en gel), como cromatografía de Q - sefarosa, cromatografía de intercambio de iones y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos habituales, como ultrafiltración, cristalización, precipitación salina, diálisis y electroforesis nativa en gel. Procedimientos adecuados se describen por ejemplo en Cooper, F. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York o en Scopes, R., *Protein Purification*, editorial Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Además, para el aislamiento del péptido recombinante o de la proteína precursora pueden utilizarse sistemas de vectores u oligonucleótidos que prolongan el ADNc en secuencias de nucleótidos determinadas y, con ello, codifican para polipéptidos modificados o proteínas de fusión, los cuales por ejemplo se utilizan para una depuración más simple. Las modificaciones adecuadas de esa clase son por ejemplo los así llamados "tags" que actúan como anclajes, como por ejemplo la modificación conocida como anclaje de hexa- histidina, o epítomos, los cuales pueden detectarse como antígenos de anticuerpos (descrito por ejemplo en Harlow, E. and Lane, D., 1988, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Esos anclajes pueden utilizarse para la adhesión de proteínas en un cuerpo sólido, como por ejemplo en una matriz de polímeros, la cual por ejemplo puede estar cargada en una columna de cromatografía, o puede utilizarse en una placa de microtitulación, o en otro soporte.

Al mismo tiempo, esos anclajes pueden utilizarse también para la detección de las proteínas. Para detectar las proteínas pueden utilizarse además marcadores habituales, como colorantes de fluorescencia, marcadores de enzimas, los cuales después de la reacción con un sustrato forman un producto de reacción detectable, o marcadores radiactivos, solos o en combinaciones con los anclajes para la derivatización de las proteínas.

En particular, la producción de las proteínas precursoras repetitivas tiene lugar mediante la expresión de secuencias de genes producidas sintéticamente, las cuales codifican para las proteínas precursoras repetitivas según la invención. Una posibilidad para producir secuencias de genes sintéticas está descrita en Hummerich et al. Biochemistry 43; 13604-13612 (2004).

Las proteínas precursoras repetitivas pueden estar presentes de forma soluble o no soluble en la célula huésped. En ambos casos las células se maceran. En particular, la maceración tiene lugar mediante un homogeneizador a alta presión a 1000 - 1500 bar. En las proteínas precursoras repetitivas solubles una gran parte de las proteínas celulares precipitan mediante el calentamiento del lisado a 60 - 100°C, como a 70 - 90°C o a 75 - 85°C, y se separa de la proteína precursora repetitiva soluble mediante un procedimiento de separación adecuado (por ejemplo sedimentación o filtración). A continuación, la proteína precursora repetitiva precipita mediante la adición de una sal cosmotrópica (del modo antes descrito). De este modo, las proteínas precursoras repetitivas forman productos de asociación estables. Las concentraciones finales de las sales cosmotrópicas agregadas pueden variar dependiendo del producto de asociación y se ubican por ejemplo en el rango de aproximadamente 0,2 - 3 M, o por ejemplo 0,8- 2 M. Las concentraciones óptimas pueden determinarse de modo más sencillo, de forma corriente para el químico especialista en proteínas.

El ensamblaje de las proteínas precursoras repetitivas puede tener lugar sin activadores externos. De este modo, las proteínas precursoras repetitivas ya se ensamblan en la célula huésped, formando productos de asociación estables correspondientes. Los productos de asociación, después de la maceración de las células, se separan mediante un procedimiento de separación adecuado (por ejemplo sedimentación o filtración) de componentes solubles.

La separación de los productos de asociación puede mejorarse mediante la adición de medios auxiliares de precipitación después de la maceración de las células. Los medios de precipitación provocan otra aglomeración de los productos de asociación, debido a lo cual, por ejemplo durante la sedimentación, deben emplearse aceleraciones más reducidas para separar los productos de asociación del medio acuoso. Como medios auxiliares de precipitación pueden utilizarse ácidos, lejías, soluciones de polímeros, en particular soluciones acuosas de polímeros cargados. Ejemplos de medios auxiliares de precipitación son el ácido fosfórico o soluciones de polietilenimina.

Los productos de asociación estables de proteínas precursoras repetitivas además pueden purificarse. Para esa purificación se utilizan soluciones en las cuales los productos de asociación estables son insolubles; se disuelven en cambio otras impurezas. En particular se utilizan soluciones acuosas de bases, ácidos, urea, sales y detergentes. De manera especialmente adecuada se utilizan soluciones de hidróxidos alcalinos, urea, sales de guanidinio o detergentes cargados, como por ejemplo sales de alquil trimetil amonio o sulfatos de alquilo. En particular se utilizan soluciones de $\geq 0,2$ M hidróxido de sodio, ≥ 2 M urea, ≥ 1 M hidrocloreuro de guanidinio, ≥ 1 M tiocianato de guanidinio o $\geq 0,1\%$ dodecilsulfato de sodio o $\geq 0,1\%$ bromuro de cetil trimetil amonio. Para la purificación, los productos de asociación estables se resuspenden en las soluciones correspondientes y a continuación se separan de la solución mediante un procedimiento de separación adecuado (por ejemplo sedimentación o filtración). A continuación, las proteínas precursoras repetitivas se lavan con agua y se secan según métodos corrientes para el experto.

Para obtener los péptidos desde la proteína precursora repetitiva, esas secuencias deben escindirse desde las proteínas precursoras y deben separarse desde las secuencias auxiliares. La escisión tiene lugar en las secuencias de escisión contenidas en las proteínas precursoras repetitivas. Los métodos para la escisión específica de cadenas de aminoácidos están descritos en las publicaciones. Las proteínas precursoras repetitivas pueden escindirse de forma enzimática o química. Ejemplos de enzimas con las cuales cadenas de aminoácidos pueden escindirse de forma específica, son Arg-C proteinasa, Asp-N-Endopeptidasa, caspasas, quimotripsina, clostripain, enteroquinasa, factor Xa, glutamil endopeptidasa, granzima B, LysC lisilendopeptidasa (Achromobacter proteinasa I), LysN peptidil-Lis metalloendopeptidasa, pepsina, prolina, endopeptidasa, proteinasa K, peptidasa I estafilococal, termolisina, trombina, tripsina. Ejemplos de sustancias químicas, con las cuales cadenas de aminoácidos pueden escindirse de

forma específica, son BNPS-escatol (2-(2'-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3-bromoinolenina), bromuro de cianógeno, ácidos, hidroxilamina, ácido yodobenzoico, NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico).

5 En particular, las proteínas precursoras repetitivas se escinden de forma química, como por ejemplo mediante la escisión con hidroxilamina o ácido. Para la escisión de ácido es adecuado cualquier ácido inorgánico u orgánico con un valor pK_s menor que 5 y mayor que 0, preferentemente menor que 4 y mayor que 1. En particular, para la escisión se utilizan 1 - 5 % de ácido fosfórico o 1 - 5 % de ácido fórmico. En función de las condiciones de la escisión de ácido tiene lugar una escisión simple entre los aminoácidos Asp y Pro o Asp y Xxx, donde Xxx representa cualquier aminoácido proteinógeno o primero tiene lugar una escisión entre los aminoácidos Asp y Pro, así como Asp y Xxx, y a continuación tiene lugar una escisión completa del aspartato del aminoácido que se encuentra de forma N-terminal, antes del aspartato, en la secuencia de aminoácidos del péptido.

10 La escisión puede tener lugar con la proteína precursora repetitiva purificada o con una fracción de la célula que contiene la proteína precursora repetitiva (por ejemplo componentes solubles de la célula huésped o componentes no solubles de una célula huésped) o con células huésped intactas que contienen la proteína precursora repetitiva. Después de la escisión debe inactivarse la sustancia de escisión. Los métodos para ello son conocidos por el experto.

15 Después de la inactivación, la carga de escisión, entre otros, contiene el péptido deseado, secuencias auxiliares disociadas, así como sustancias de escisión inactivas. Los péptidos, en esa solución, ya pueden poseer su actividad deseada. Si se requiere una mayor pureza, entonces, después de la escisión, los péptidos liberados desde las proteínas precursoras repetitivas pueden separarse desde las secuencias auxiliares. Una ventaja de las secuencias auxiliares autoensamblantes reside en el hecho de que las secuencias auxiliares se ensamblan durante o después de la escisión. Ese ensamblaje puede tener lugar de forma espontánea durante la escisión, bajo las condiciones de escisión seleccionadas, o mediante la adición de sustancias que respaldan el ensamblaje de las secuencias auxiliares. Las sustancias de esa clase, que promueven el ensamblaje, son por ejemplo sales cosmotrópicas que contienen al menos una clase de iones, la cual, en correspondencia con la así llamada Serie de Hofmeister, presenta propiedades cosmotrópicas más intensas que los iones de sodio o de cloruro. Otras sustancias que promueven el ensamblaje son ácidos, lejías o disolventes orgánicos que pueden mezclarse con agua, como por ejemplo alcoholes. Las secuencias auxiliares ensambladas pueden separarse del péptido soluble liberado, mediante sedimentación o filtración. Otros pasos de purificación pueden ser necesarios para separar impurezas residuales de proteínas o de péptidos, sales, u otras sustancias agregadas durante o después de la escisión, del péptido deseado. Para ello pueden utilizarse por ejemplo métodos cromatográficos, precipitaciones, diálisis, extracciones de 2 fases y otros procedimientos corrientes para el experto.

20 A continuación, la solución que contiene péptidos puede utilizarse directamente para la aplicación deseada, o la solución puede secarse con medios corrientes para el experto (por ejemplo secado por pulverización o secado por congelación), y puede utilizarse el producto seco correspondiente.

25 Después del secado existe la posibilidad de poder eliminar impurezas que no pueden separarse del péptido, en tanto éste se encuentre disuelto en agua, mediante un lavado con disolventes, en los cuales el péptido no es soluble. Para ello son adecuados disolventes orgánicos, como por ejemplo n-hexano N-metilpirrolidona o mezclas de disolventes y ácidos, como por ejemplo mezclas de n-hexano y ácido acético o ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético o ácido hexanoico. Para ese paso de purificación, el péptido seco se resuspende en el disolvente / en la mezcla correspondiente, y a continuación se separa nuevamente mediante sedimentación o filtración. Los residuos del disolvente/mezcla de disolventes pueden separarse mediante secado.

30 Los péptidos deseados pueden poseer la actividad deseada en la forma obtenida mediante la escisión. Sin embargo, también puede ser necesario modificar aún más los péptidos después de la escisión. Por ejemplo, el péptido puede amidarse, esterificarse, oxidarse, alquilarse o asociarse químicamente con cualquier molécula. Ejemplos de moléculas que pueden utilizarse para modificaciones de esa clase son alcoholes, ésteres de alcohol- cisteína, ácidos carboxílicos, tioésteres o maleinimidas. En particular, para las modificaciones de esa clase se utilizan moléculas que aumentan la hidrofobicidad del péptido. Las moléculas de esa clase pueden contener radicales de alquilo modificados o no modificados, como se define más arriba. Preferentemente, las moléculas de esa clase contienen radicales de alquilo C_2-C_{16} , en particular C_6-C_{14} . Los procedimientos correspondientes son conocidos por el experto. La modificación puede tener lugar en cualquier momento: por ejemplo directamente después de la maceración de la célula, después de la depuración de la proteína precursora, después de la escisión de la proteína precursora o después de la depuración del péptido.

35 Las soluciones de péptidos que presentan el grado de pureza deseado, pueden utilizarse de forma directa. De manera alternativa pueden aplicarse diferentes métodos de conservación para un almacenamiento a largo plazo. Ejemplos de métodos de conservación son refrigeración, congelación, adición de conservantes. De manera alternativa los péptidos pueden secarse. Son ejemplos de métodos de secado la liofilización o el secado por pulverización. A continuación, los péptidos secados pueden almacenarse. Para la utilización de los péptidos, la

sustancia secada se disuelve en un disolvente adecuado, preferentemente en una solución acuosa. Esa solución acuosa puede contener sales o sustancias tampón, o puede no contener otros aditivos.

8. Definición de otros conceptos generales diferentes

- 5 Como una secuencia "derivada" de una secuencia descrita de forma concreta u "homóloga" con respecto a la misma, por ejemplo una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos derivada, según la invención, si no se proporcionan otros datos, se entiende una secuencia que con la secuencia inicial presenta una identidad de al menos 80 % o de al menos 90 %, en particular de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99%.

PARTE EXPERIMENTAL

- 10 La aplicabilidad universal del método descrito en la presente invención para la producción de cualquier secuencia de péptidos (Pep) se muestra mediante la producción de tres péptidos diferentes (ZnO, P18, Min) en la secuencia y en la composición del aminoácido.

Si no se proporcionan otros datos, entonces se emplean métodos estándar de la analítica orgánica y bioquímica, así como de la producción recombinante de proteínas y cultivo de microorganismos.

Ejemplo 1: Producción del péptido ZnO (SEQ ID NO:20)

- 15 El péptido ZnO es un péptido derivado de una secuencia publicada, el cual influye en la formación de partículas de óxido de cinc (Umetsu et al. Adv. Mat. 17: 2571-75 (2005)). Un gen sintético ZnO₄ (SEQ ID NO:21), mediante la utilización de endonucleasas de restricción BamHI y HindIII, clonadas en el vector pAZL descrito en Hummerich et al. Biochemistry 43; 13604-13612 (2004), fue dimerizado según el protocolo allí descrito y clonado en el vector pET21 (Novagen). La secuencia que se encuentra presente a continuación en ese vector codifica para la proteína precursora repetitiva ZnO₈ (SEQ ID NO:22). La proteína precursora repetitiva contiene 8 unidades de repetición que respectivamente contienen una copia del péptido ZnO y una secuencia auxiliar. La secuencia auxiliar contiene una secuencia de poli- alanina y otorga propiedades autoensamblantes a la proteína precursora repetitiva. Entre las secuencias auxiliares y las secuencias de péptidos se encuentran los aminoácidos Asp-Pro que deben posibilitar una escisión selectiva del péptido ZnO proveniente de la proteína precursora, con ácido. La expresión tuvo lugar en la cepa E.coli BL21 [DE3] (Novagen).
- 20
- 25

El cultivo y la síntesis de proteínas tuvo lugar a pO₂>20% y a un pH=6,8 en el procedimiento de lote alimentado.

Medio:

| | |
|----------|--|
| 8 Litros | Agua |
| 25 g | Monohidrato de ácido cítrico |
| 40 g | Glicerina (99 %) |
| 125 g | Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄) |
| 62,5 g | Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄) |
| 18,8 g | Heptahidrato sulfato de magnesio (MgSO ₄ * 7H ₂ O) |
| 1,3 g | Dihidrato de cloruro de calcio (CaCl ₂ * 2H ₂ O) |
| 155 ml | Solución salina -trazas |
| | completar con agua a 9,8 litros |
| | regular el valor pH a 6,3 con NaOH al 25 % en peso |
| 3 ml | Tego KS 911 (antiespumante; productos Goldschmidt) |
| 1 g | Ampicilina |

ES 2 763 168 T3

190 mg Hidrocloruro de tiamina

20 mg Vitamina B12

Solución salina -trazas:

5 Litros Agua

200,00 g Monohidrato de ácido cítrico

55,00 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

42,50 g $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

15,00 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4,00 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1,25 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Solución de alimentación:

5

1125 g Agua

41,3 g Monohidrato de ácido cítrico

81,6 g Sulfato de sodio (Na_2SO_4)

6,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

4734 g Glicerina 99,5 %

Después de consumida la glicerina contenida en el medio base se inició una alimentación constante con una tasa de 100 ml/h.

10 La síntesis de proteína fue inducida mediante la adición de 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, después de lo cual el cultivo de bacterias alcanzó una densidad óptica $\text{OD}_{600}=60$. En ese momento, la temperatura del cultivo bajó de 37°C a 30°C. 5 h después de la inducción se recolectaron las células.

La depuración del ZnO_8 se realizó según el siguiente protocolo:

- Resuspensión del pellet de células en 5 ml por gramo de masa húmeda 20 mM MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanoico) pH 7,0

15 - Maceración de las células en el homogeneizador de alta presión a 1400 bar

- Centrifugación 30 min, 5000xg

- Incubación del líquido sobrenadante 30 min a 80°C

- Centrifugación 30 min, 5000xg

- Precipitación del ZnO₈ desde el líquido sobrenadante mediante la adición de 1,8 M sulfato de amonio (concentración final) durante la noche a 4°C

- Lavado del pellet con 8 M urea

- 2 x lavado del pellet con agua

5 - Liofilización

- El ZnO₈ liofilizado se almacenó a -20°C.

Se obtuvieron 2,2 g de ZnO₈ puro por litro de medio de cultivo.

10 Para la escisión, 250 mg de la proteína precursora liofilizada ZnO₈ se resuspendieron en 5mL de ácido fórmico 1% y se incubaron por 6 h a 90°C. Durante esa incubación se separó el liofilizado y se produjo una sustancia a modo de un gel. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la sustancia a modo de gel, mediante sedimentación, en 18000 x g, se separó de los componentes solubles. La solución restante se neutralizó con 2M NaOH. A continuación, la solución fue liofilizada. El liofilizado contenía el producto de escisión deseado, así como formiato de sodio obtenido a partir de la neutralización del ácido fórmico.

15 El producto liofilizado se analizó mediante HPLC: Para ello, el producto se disolvió con una concentración de 1 mg/ml en agua y se analizó con una columna de cromatografía de fase inversa (Jupiter Proteo 4,6 x 250 mm; Phenomenex). Como diluyente se utilizó 0,1% ácido trifluoroacético en agua, el cual, con un gradiente lineal, fue reemplazado por 0,1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La detección tuvo lugar a 206 nm (figura 2). Para otro análisis se recolectaron las fracciones del pico principal y se analizó aún más la sustancia contenida dentro. La secuenciación N-terminal confirmó que ese componente se trata del péptido ZnO. Los análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) dieron como resultado una masa de 2002, la cual es idéntica a la masa teórica del péptido ZnO (figura 3). El análisis HPLC dio como resultado una pureza de 62 %, referido a componentes UV- activos.

20 Ejemplo 2: Producción del péptido P18 (SEQ ID NO: 23)

25 El péptido P18 es un péptido que se deriva de una secuencia de péptidos antimicrobiana altamente efectiva, la cual fue descrita por Shin et al. J. Peptide Res. 58:504-14 (2001). Un gen sintético AHeAP18₂ (SEQ ID NO:24), mediante la utilización de endonucleasas de restricción BamHI y HindIII, clonadas en el vector pAZL descrito en Hummerich et al. Biochemistry 43; 13604-13612 (2004), fue dimerizado según el protocolo allí descrito y clonado en el vector pET21 (Novagen). La secuencia que se encuentra presente a continuación en ese vector codifica para la proteína precursora repetitiva AHeAP18₄ (SEQ ID NO:25). La proteína precursora repetitiva contiene 4 unidades de repetición que respectivamente contienen una copia del péptido P18 y una secuencia auxiliar. La secuencia auxiliar contiene dos secuencias de poli- alanina y otorga propiedades autoensamblantes a la proteína precursora repetitiva. Además, la secuencia auxiliar contiene una secuencia de protección helicoidal cargada de forma negativa. Entre las secuencias auxiliares y las secuencias de péptidos P18 se encuentran los aminoácidos Asp-Pro que deben posibilitar una escisión selectiva del péptido P18 proveniente de la proteína precursora, con ácido. La expresión tuvo lugar en la cepa E.coli BL21 [DE3] (Novagen).

35 El cultivo y la síntesis de proteínas tuvo lugar a pO₂>20% y a un pH=6,8 en el procedimiento de lote alimentado. El medio, la solución salina - trazas y la solución de alimentación tenían la composición descrita en el Ejemplo 1.

Después de consumida la glicerina contenida en el medio base se inició una alimentación constante con una tasa de 100 ml/h.

40 La síntesis de proteína fue inducida mediante la adición de 1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, después de lo cual el cultivo de bacterias alcanzó una densidad óptica OD₆₀₀=60. 10 h después de la inducción, las células se recolectaron mediante sedimentación a 5000 x g por 30 min. La masa húmeda biológica ascendió a 1932g.

La masa húmeda biológica se depuró mediante el siguiente protocolo:

45 - Resuspensión del pellet de células: por g de biomasa se agregaron 6 g de 20 mM tampón de fosfato de sodio (pH 7,5) y

se mezcló.

- Maceración de las células en el homogeneizador de alta presión a 1500 bar

ES 2 763 168 T3

- Adición de ácido fosfórico hasta el valor pH = $3 \pm 0,5$
 - 10 min de incubación a 23 °C mediante agitación
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - 5 - Resuspensión del pellet: por g de masa húmeda agregar 25 mL de 0,2 M NaOH, homogeneizar e incubar 4 horas a 23 °C mediante agitación
 - Neutralización: regular el valor pH de $8,5 \pm 0,5$ con H₃PO₄ al 85 % en peso
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - El pellet compuesto por cuerpos de inclusión lavados que contienen la proteína precursora P18, se hidrolizó, así como escindió, mediante H₃PO₄ al 2 % en peso.
 - 10 Condiciones de la escisión:
 - i. Por g de pellet utilizar 5 mL de H₃PO₄
 - ii. Homogeneizar
 - iii. Incubar 16 horas a 90 °C mediante agitación.
 - Dejar enfriar la carga de escisión.
 - 15 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Neutralización: regular el valor pH de $5,5 \pm 0,5$ con 10 M NaOH
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Diluir el líquido sobrenadante con agua hasta una conductividad menor que 10 mS/cm
 - 20 - Depurar el P18 desde el líquido sobrenadante mediante cromatografía por intercambio de cationes (Fractogel COO; Merck); elución con 450 mM NaCl
 - Acumular las fracciones que contienen el péptido y diluir con agua hasta una conductividad menor que 10 mS/cm
 - Depurar el P18 desde las fracciones acumuladas mediante cromatografía por intercambio de cationes (Fractogel COO; Merck); elución con 50 mM HCl
 - El eluato se neutralizó con 2 M NaOH.
 - 25 - La solución neutralizada fue liofilizada.
- El producto liofilizado se analizó mediante HPLC: Para ello, el producto se disolvió con una concentración de 1 mg/ml en agua y se analizó con una columna de cromatografía de fase inversa (Jupiter Proteo 4,6 x 250 mm; Phenomenex). Como diluyente se utilizó 0,1% ácido trifluoroacético en agua, el cual, con un gradiente lineal, fue reemplazado por 0,1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La detección tuvo lugar a 280 nm (figura 4). Para otro
- 30 análisis se recolectaron las fracciones del pico principal y se analizó aún más la sustancia contenida dentro. La secuenciación N-terminal confirmó que ese componente se trata del péptido P18.
- Los análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), para el péptido, dieron como resultado una masa de 2512, la cual es idéntica a la masa teórica del péptido P18 (figura 5). El análisis HPLC dio como resultado una pureza de 85 %, referido a componentes UV- activos. De 30 g de masa húmeda biológica se obtuvieron 52 mg de péptido P18. De este modo, por litro de cultivo de fermentación pueden obtenerse aproximadamente 330 mg de péptido P18 puro.- 35

Para analizar la actividad del péptido P18, cultivos de E. coli B se incubaron en medio LB (5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de triptona, 5 g/l de cloruro de sodio) que presentaban una densidad óptica de 0,1, medido a 600 nm, con diferentes concentraciones del péptido P18 mediante agitación a 37 °C. Se realizó un seguimiento del

crecimiento de las bacterias mediante la medición de la densidad óptica después de 24 h. Una inhibición completa del crecimiento (densidad óptica a 600 nm después de 24 h < 0,15) se alcanzó en el caso de una concentración del péptido a partir de 31 ppm. Otra mejora de la actividad antimicrobiana pudo alcanzarse mediante una amidación del grupo carboxilo C- terminal. Para ello, los grupos carboxilo se activaron con hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxi-sulfosuccinimida, y se amidizaron mediante la adición subsiguiente de amoníaco.

Ejemplo 3: Producción del péptido Min (SEQ ID NO: 26)

Un gen sintético AEMin4 (SEQ ID NO:27), mediante la utilización de endonucleasas de restricción BamHI y HindIII, clonadas en el vector pAZL descrito en Hummerich et al. Biochemistry 43; 13604-13612 (2004), fue dimerizado según el protocolo allí descrito y clonado en el vector pET21 (Novagen). La secuencia que se encuentra presente a continuación en ese vector codifica para la proteína precursora repetitiva AEMin₈ (SEQ ID NO:28). La proteína precursora repetitiva contiene 8 unidades de repetición que respectivamente contienen una copia del péptido Min y una secuencia auxiliar. La secuencia auxiliar contiene una secuencia de poli- alanina y otorga propiedades autoensamblantes a la proteína precursora repetitiva. Además, la secuencia auxiliar contiene una secuencia de protección cargada de forma negativa. Entre las secuencias auxiliares y las secuencias de péptidos se encuentran los aminoácidos Asp-Pro que deben posibilitar una escisión selectiva del péptido P18 proveniente de la proteína precursora, con ácido. La expresión tuvo lugar en la cepa E.coli BL21 [DE3] (Novagen).

El cultivo y la síntesis de proteínas tuvo lugar a pO₂>20% y a un pH=6,8 en el procedimiento de lote alimentado. El medio, la solución salina - trazas y la solución de alimentación tenían la composición descrita en el Ejemplo 1.

Después de consumida la glicerina contenida en el medio base se inició una alimentación constante con una tasa de 100 ml/h.

La síntesis de proteína fue inducida mediante la adición de 1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, después de lo cual el cultivo de bacterias alcanzó una densidad óptica OD₆₀₀=60. En ese momento, la temperatura del cultivo bajó de 37°C a 30°C. 5 h después de la inducción se recolectaron las células.

La depuración del AEMin₈ se realizó según el siguiente protocolo:

- Resuspensión del pellet de células en 5 ml por gramo de masa húmeda 20 mM MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanoico) pH 7,0

- Maceración de las células en el homogeneizador de alta presión a 1400 bar

- Centrifugación 30 min, 5000xg

- Incubación del líquido sobrenadante 20 min a 80°C

- Centrifugación 30 min, 5000xg

- Precipitación del AEMin₈ desde el líquido sobrenadante mediante la adición de 2 M sulfato de amonio (concentración final) durante la noche a 4°C

- Lavado del pellet con 8 M urea

- 2 x lavado del pellet con agua

- Liofilización

- El AEMin₈ liofilizado se almacenó a -20°C.

Se obtuvieron 0,4 g de AEMin8 puro por litro de medio de cultivo.

Para la escisión, 250 mg de la proteína precursora liofilizada AEMin₈ se resuspendieron en 12,5mL de ácido fosfórico 1% y se incubaron por 8 h a 90°C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, las sustancias no solubles, mediante sedimentación, en 18000 x g, se separaron de los componentes solubles. La solución restante se neutralizó con 2M NaOH. A continuación, la solución fue liofilizada. El liofilizado contenía el producto de escisión deseado, así como fosfato disódico obtenido a partir de la neutralización del ácido fosfórico.

- 5 El producto liofilizado se analizó mediante HPLC: para ello, el producto se disolvió con una concentración de 1 mg/ml en agua y se analizó con una columna de cromatografía de fase inversa (Jupiter Proteo 4,6 x 250 mm; Phenomenex). Como diluyente se utilizó 0,1% ácido trifluoroacético en agua, el cual, con un gradiente lineal, fue reemplazado por 0,1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La detección tuvo lugar a 206 nm (figura 6). Para otro análisis se recolectaron las fracciones del pico principal y se analizó aún más la sustancia contenida dentro. La secuenciación N-terminal confirmó que ese componente se trata del péptido Min. Los análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), para el péptido, dieron como resultado una masa de 1900, la cual es idéntica a la masa teórica del péptido Min (figura 7). El análisis HPLC dio como resultado una pureza de 68 %, referido a componentes UV- activos.
- 10 Ejemplo 4: Optimización de la producción del péptido P18 (SEQ ID NO: 23)
- Para aumentar el rendimiento del péptido P18 del Ejemplo 2 se analizó la influencia de determinadas secuencias Aux en el rendimiento del péptido. Un claro incremento de la expresión y el rendimiento total se alcanzó con el gen sintético A-He2AP18₂ (SEQ ID NO:74), el cual, después de la clonación en el vector pET21, en correspondencia con el Ejemplo 2, codifica para la proteína precursora con la SEQ ID NO:75. La fermentación tuvo lugar bajo las
- 15 condiciones descritas en el Ejemplo 2.
- La masa húmeda biológica se depuró mediante el siguiente protocolo:
- Resuspensión del pellet de células: por g de biomasa se agregaron 6 g de agua y se mezcló
 - Maceración de las células en el homogeneizador de alta presión a 1500 bar
 - Adición de ácido fosfórico hasta el valor pH = $3 \pm 0,5$
- 20 - 10 min de incubación a 23 °C mediante agitación
- Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Resuspensión del pellet: por g de masa húmeda agregar 20 mL de 0,4 M NaOH, homogeneizar e incubar 1 hora a 23 °C mediante agitación
 - Neutralización: regular el valor pH de $8,5 \pm 0,5$ con 1 M tampón de fosfato de potasio a pH 6.0
- 25 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- El pellet compuesto por cuerpos de inclusión lavados que contienen la proteína precursora P18, se hidrolizó, así como escindió, mediante H₃PO₄ al 2 % en peso.
- Condiciones de la escisión:
- i. Por g de pellet utilizar 7 mL de H₃PO₄
 - 30 ii. Homogeneizar
 - iii. Incubar 16 horas a 90 °C mediante agitación
- Dejar enfriar la carga de escisión
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Regular el valor pH de $4,0 \pm 0,5$ con 25 % NaOH
- 35 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- Diluir el líquido sobrenadante con agua hasta una conductividad menor que 30 mS/cm
 - Depurar el P18 desde el líquido sobrenadante mediante cromatografía por intercambio de cationes (SP-Sepharose High Performance; GE Healthcare); tampón de lavado: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 450 mM NaCl; tampón de elución: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 1100 mM NaCl

- Precipitación del péptido mediante la adición de 25% NaOH para el eluato hasta pH= 10,5 ± 0,3
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Resuspensión del pellet en 5 ml de agua por gramo de masa húmeda
 - Separación del péptido: Adición de ácido acético hasta pH 6,0 pH= 10,5 ± 0,5
- 5 - Liofilización

Del modo descrito, por litro de cultivo de fermentación, puede obtenerse aproximadamente 1g de péptido P18 puro.

Ejemplo 5: Producción del péptido SEQ ID NO: 6

10 Los péptidos indicados en los Ejemplos 1 a 4 se obtuvieron mediante escisión de ácido, desde la proteína precursora repetitiva. De este modo, se hidroliza el enlace peptídico entre un aspartato y una prolina. De manera correspondiente, como se muestra en el Ejemplo 1, la secuencia de péptidos de forma N - terminal comienza con una prolina y termina de forma C-terminal con un aspartato. Bajo condiciones determinadas, el aspartato C-terminal, como se muestra en los Ejemplos 2 y 3, puede igualmente disociarse, permitiendo producir secuencias de péptidos con una secuencia C-terminal que puede seleccionarse libremente.

15 Para mostrar que con el procedimiento según la invención también pueden producirse péptidos en los cuales el término N no comienza con una prolina, sino en los cuales el primer aminoácido N-terminal puede seleccionarse libremente, el péptido se produjo con la SEQ ID NO:6. Para ello, en correspondencia con el Ejemplo 4, mediante la utilización del gen sintético AHe2AP18₂-P-G (SEQ ID NO:76), la proteína precursora se produjo con la SEQ ID NO:77. Esta proteína precursora se diferencia de la proteína precursora SEQ ID NO:75 del Ejemplo 4 solamente en el hecho de que los aminoácidos N-terminales del péptido P18 Pro-Gly y Gly C-terminal están suprimidos. La

20 clonación y la fermentación tuvieron lugar bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 4.

La masa húmeda biológica se depuró mediante el siguiente protocolo:

- Resuspensión del pellet de células: por g de biomasa se agregaron 6 g de agua y se mezcló
 - Maceración de las células en el homogeneizador de alta presión a 1500 bar
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- 25 - El pellet compuesto por cuerpos de inclusión que contienen la proteína precursora P18, se hidrolizó, así como escindió, mediante H₃PO₄ al 5 % en peso.

Condiciones de la escisión:

- i. Por g de pellet utilizar 5 mL de H₃PO₄
 - ii. Homogeneizar
 - 30 iii. Incubar 16 horas a 90 °C mediante agitación
- Dejar enfriar la carga de escisión
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
 - Regular el valor pH de 4,0 ± 0,5 con 25 % NaOH
 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- 35 - Diluir el líquido sobrenadante con agua hasta una conductividad menor que 30 mS/cm

- Depurar el péptido desde el líquido sobrenadante mediante cromatografía por intercambio de cationes (SP-Sepharose High Performance; GE Healthcare); tampón de lavado: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 450 mM NaCl; tampón de elución: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 1100 mM NaCl

- Precipitación del péptido mediante la adición de 25% NaOH para el eluato hasta pH= 10,5 ± 0,3
- Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- Resuspensión del pellet en 5 ml de agua por gramo de masa húmeda
- Separación del péptido mediante la adición de ácido acético hasta pH = 6,0 ± 0,5

5 - Liofilización

El producto liofilizado se analizó mediante HPLC. Para ello, el producto se disolvió en agua con una concentración de 1 mg/ml y se analizó con una columna de cromatografía de fase inversa (Jupiter Proteo 4,6 x 250 mm; Phenomenex). Como diluyente se utilizó 0,1% ácido trifluoroacético en agua, el cual, con un gradiente lineal, fue reemplazado por 0,1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La detección tuvo lugar a 280 nm (figura 8). Para otro análisis se recolectaron las fracciones del pico principal y se analizó aún más la sustancia contenida dentro. Los análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), para el péptido, dieron como resultado una masa de 2300,6, la cual es igual a la masa teórica del péptido SEQ ID NO: 6 (figura 9).

Ejemplo 6: Amidación de péptido P18 liofilizado (SEQ ID NO: 23)

En determinados casos, para la actividad de un péptido puede ser ventajoso que el término - C no se encuentre presente como grupo carboxilo libre, sino que esté amidado. Para mostrar esto, péptido P18 liofilizado del Ejemplo 4 se amidizó según el siguiente protocolo:

- + 10 mg/ml de péptido P18
- + 30 % EtOH
- + 10 mM de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico pH5,0
- 20 + 3M de cloruro de amonio
- + 2,5 mM de N-hidroxisuccinimida
- + 50 mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- + Incubación 2h @ temperatura ambiente
- + Neutralización con NaOH pH 7,0

25 La muestra amidada se analizó mediante HPLC con una columna de cromatografía Luna SCX 5µ 100A (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Como eluyente se utilizaron 20mM KH₂PO₄ pH2,5 con 25% acetonitrilo, el cual, con un gradiente lineal, se reemplazó por 20mM KH₂PO₄ pH2,5; 25% acetonitrilo y 1 M KCl. La detección tuvo lugar a 280 nm (figura 10). Para una comparación, en la figura 10 está representado el cromatograma de un péptido de referencia sintetizado químicamente y amidado, con la secuencia del péptido "P18" (producido por encargo de Bachem AG, Bubendorf, Suiza).

30 El péptido se depuró después mediante cromatografía por intercambio de cationes, como se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplo 7: Producción del péptido P18 (SEQ ID NO: 23) con amidación integrada

35 Para mejorar la eficiencia de costes de la producción de péptido P18 amidado, en lugar de una amidación a continuación de una depuración del péptido, como está descrito en el Ejemplo 6, la amidación se integró en el procedimiento de procesamiento. Para ello, la proteína precursora SEQ ID NO:75, en correspondencia con el Ejemplo 4, se obtuvo mediante fermentación, y el péptido se liberó mediante escisión de ácido, desde la proteína precursora.

A continuación se realizaron los siguientes pasos:

- 40 - Dejar enfriar la carga de escisión.

ES 2 763 168 T3

- Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- Regular el valor pH de $10,5 \pm 0,5$ con 25 % NaOH
- Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- Separar el pellet en 3 ml de etanol por g de masa húmeda
- 5 - Separar por centrifugación; determinación del péptido en el líquido sobrenadante (diluir)
- Mezcla de los siguientes componentes:
 - a. 12,5 ml de péptido disuelto en etanol
 - b. 4,2 ml de agua
 - c. Adición de 400 μ l de 500mM de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
 - 10 d. Regular a pH 5,0 con HCl
 - e. Adición de 2,14 g de cloruro de amonio
 - f. 200 μ l de 500 mM N-hidroxisuccinimida
 - g. 1 ml 1 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- Incubación 2h @ a temperatura ambiente
- 15 - Diluir la carga con agua hasta una conductividad menor que 30 mS/cm
- Depurar el péptido P18 modificado mediante cromatografía por intercambio de cationes (SP-Sepharose High Performance; GE Healthcare); tampón de lavado: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 450 mM NaCl; tampón de elución: 10 mM tampón de acetato de sodio pH 4 + 1100 mM NaCl
- Precipitación del péptido mediante la adición de 25% NaOH para el eluato hasta pH= $10,5 \pm 0,3$
- 20 - Centrifugación: 20 min, min. 5000 xg
- Resuspensión del pellet en 5 ml de agua por gramo de masa húmeda
- Separación del péptido: Adición de ácido acético hasta pH $6,0 \pm 0,5$
- Liofilización
- 25 La muestra amidada se analizó mediante HPLC con una columna de cromatografía Luna SCX 5 μ 100A (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Como eluyente se utilizaron 20mM KH₂PO₄ pH2,5 con 25% acetonitrilo, el cual, con un gradiente lineal, se reemplazó por 20mM KH₂PO₄ pH2,5; 25% acetonitrilo y 1 M KCl. La detección tuvo lugar a 280 nm (figura 11). Para una comparación, en la figura 11 está representado el cromatograma de un péptido de referencia sintetizado químicamente y amidado, con la secuencia del péptido "P18" (producido por encargo de Bachem AG, Bubendorf, Suiza).

30

Resumen de las secuencias según la invención

| SEQ ID NO: (Nº de identificación secuencia) | Secuencia | Denominación Tipo |
|---|-----------|----------------------|
| | | |

ES 2 763 168 T3

| | | |
|----|--|--------------------------------|
| | | |
| 1 | GSSAAAAAAAAASGP | SA |
| 2 | GSSAAAAAAAAASGP | SA |
| 3 | GSAAAAAAAAASGP | SA |
| 4 | GSVVVVVVVSGP | SA |
| 5 | GSVVAAVVAASGP | SA |
| 6 | KWKLFKKIPKFLHLAKKF | Pep |
| 7 | X ₁ X ₂ K X ₃ X ₄ X ₅ KIP X ₁₀ KFX ₆ X ₇ X ₈ AX ₉ KF | Pep |
| 8 | X ₁ X ₂ K X ₃ X ₄ X ₅ KIP X ₁₁ X ₁₂ KFX ₆ X ₇ X ₈ AX ₉ KF | Pep |
| 9 | KWKLFKKIPPKFLHLAKKF | Pep |
| 10 | RWKLFKKIPKFLHLAKKF | Pep |
| 11 | FKKLFKKIPKFLHAAKKF | Pep |
| 12 | KWKLLKKIPKFKKLALKF | Pep |
| 13 | KWKLFKKIPKFLHAAKKF | Pep |
| 14 | KWKKFLKIPKFLHAAKKF | Pep |
| 15 | KWKKLLKIPKFLHAAKKF | Pep |
| 16 | FEEISEFLQSLEEF | SU helicoidal |
| 17 | EWELFEEISEFLQSLEEF | SU helicoidal |
| 18 | ELFEELAEFLQLEEFIE | SU helicoidal |
| 19 | LFEELQEFLQALEELAQFALQFLAFLQFS | SU helicoidal |
| 20 | PEAHVMHKVAPRPGGGSCGD | Pep (ZnO) |
| 21 | GGATCCATGGGTTCCAGCGCTGCGGCAGCTGCAGCGGCTG CAAGTGGTCCGGACCCGGAGGCACACGTTATGCACAATAGC GCCGCGTCCGGGTGGCGGTTCTTGTGGTGATCCGGGTAGC TCTGCGGCTGCAGCTGCGGCTGCAGCTTCCGGTCCGGACC CGGAAGCTCACGTTATGCACAAGGTTGCTCCACGCCCG GGCGGTGGCAGCTGCGGTGATCCAGCAGCTCTGCTGCG GCTGCGGCAGCGGCCGCTTCTGGCCCGGACCCGGAAGCT CACGTTATGCACAAAGTGGCTCCGCGTCCGGGTGGCGG TTCCTGCGGGATCCGGTTCTT- CCGCTGCAGCGGCTGCGGCCGAGCGTCTGGCCCGGAC- CCGAAGCA CATGTTATGCATAAAGTAGCGCCGCTCCGGGCGGTGGCTC TTGCGGTGACCCGGGCTAATGAAAGCTT | Constructo ZnO ₄ |

ES 2 763 168 T3

| | | |
|----|---|--|
| 22 | <p>MASMTGGQQMGRGSM GSSAAAAAAAAASGPD PEAHVMHKVAPRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAH- VMHKVAPRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPGSSAAAAAAAAASGPDPEAHVMHKVA- PRPGGGSCGDPG</p> | <p>ZnO₈ Péptido precursor</p> |
| 23 | PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFG | Pep (P18) |
| 24 | <p>GGATCCATGGGCTCTAGCGCTGCAGCGGCAGCTGCCGCGGCT TCTGGTCCGGTCTGTTCGAAGAGATCTCCGAATTCCTGCA GTCTCTGGAAGAGTTCGGTGGCCCGGGTTCCTCTGCAGCTG CGGCTGCAGCTGCGGCAAGCGGCCCTGACCCAGGTAAATGGA AACTGTTTAAGAAAATCCGAAATTCCTGCATCTGGCTAAAAAT TCGGTGACCCGGTTCCTCCGCTGCGGCTGCAGCTGCAGCT GCGTCCGGTCCGGTCTGTTTGAAGAAATCTCCGAATTCCTGC AGTCTCTGGAAGAAATTCGGCGGTCCGGGCTCTAGCGCTGCCG TGCAGCGGCAGCGGCTTCGGGCCCGGACCCGGGCAAATGGA AACTGTTTAAGAAAATCCGAAATTCCTGCATCTGGCTAAAAAGT TCGGCGATCCGGGCTAATGAAAGCTT</p> | <p>AheAP18₂ Constructo</p> |
| 25 | <p>MASMTGGQQMGRGSM GSSAAAAAAAAASGPLFEEISEFLQSLEEFGGPGSSAAAAAAAAASGPD PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGDP GSSAAAAAAAAASGPLFEEISEFLQSLEEFGGPGSSAAAAAAAAASGPD PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGDP GSSAAAAAAAAASGPLFEEISEFLQSLEEFGGPGSSAAAAAAAAASGPD PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGDP GSSAAAAAAAAASGPLFEEISEFLQSLEEFGGPGSSAAAAAAAAASGPD PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGDP</p> | <p>AheAP18₄ Péptido precursor</p> |
| 26 | PGERKRLIGCSVMTKPAG | Pep (Min) |
| 27 | <p>GGATCCATGGGCTCTCCGCTGCAGCCGCTG- CAGCTGCGGCTGCATCCGGTCCGGAGGCAGAGCCGGAA- GACCCGGGTGAACGT AAACGTCTGATCGGTTGTTCTGTAATGACCAAACCTGCTGGT GATCCGGGCTCCAGCGCTGCGGCTGCGGCAGCTGCAGCGGCC TCTGGTCCGGAGGCGGAACCGGAGGACCCGGGTGAACGTAAG CGCCTGATCGGCTGCAGCGTGATGACCAAACCGGCTGGTAT CCGGGTTCTTCCGCGGCTGCAGCTGCGGCAGCTGCAGCTAGTG GTCCAGAAGCAGAACCAGAAGACCCGGGTGAACGTAACGTCT GATTGGTTGCTCTGTTATGACTAAACCGGCTGGTACCCGGGC TCTCCGCGGCTGCCGCGGCTGCGGCTGCAGCTAGCGGCCCG GAAGCTGAACCGGAAGATCCGGGCGAACGCAAGCGTCTGATCG GCTGCTCCGTTATGACTAAAC- CGGCTGGCGACCCGGGCTAATGAAAGCTT</p> | <p>AEMin₄ Constructo</p> |

ES 2 763 168 T3

| | | |
|----|---|---|
| 28 | MASMTGGQQMGRGSM GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP GSSAAAAAAAAASGPEAEPEDPGERKRLIGCSVMTKPAGDP | AEMin ₈ Péptido precursor |
| 29 | NPSSLFRYLPSD | Pep |
| 30 | HGGGHGHHGGHG | Pep |
| 31 | HYPTLPLGSSTY | Pep |
| 32 | ALSPHSAPLTY | Pep |
| 33 | SAGRLSA | Pep |
| 34 | TLPNHTV | Pep |
| 35 | HTSKLGI | Pep |
| 36 | MSPHPHPRHHHTGGGK | Pep |
| 37 | EAHVMHKVAPRPGGGSC | Pep (ZnO corto) |
| 38 | SSKSGSYSGSKGSRRIL | Pep |
| 39 | PYAYMKS RDIESAQSD EEEVLRDALAD | Pep |
| 40 | PGYGYKRNRAEPAAAEAVD | Pep |
| 41 | PGKSRDIESAQSD EEEVLRD | Pep |
| 42 | PGKSRDAEPAAAGEEVD | Pep |
| 43 | SSKSGSYSGSKGSRRILGGGNPSSLFRYLPSD | Pep |
| 44 | MSPHPHPRHHHTGGGNPSSLFRYLPSD | Pep |
| 45 | NPSSLFRYLPSDGGGRREEWWD DRREEWWD | Pep |
| 46 | MSPHPHPRHHHTGGGHGGGHGHHGGHG | Pep |
| 47 | SSKSGSYSGSKGSRRILGGGHGGGHGHHGGHG | Pep |
| 48 | SSKSGSYSGSKGSRRILGGGHYPTLPLGSSTY | Pep |
| 49 | SSKSGSYSGSKGSRRILGGGSAGRLSA | Pep |
| 50 | RREEWWD DRREEWWD | Pep |
| 51 | MKQLADSLMQLARQVSRLESA | Pep |

ES 2 763 168 T3

| | | |
|----|------------------------------|---------------------|
| 52 | MKQLADSLHQLARQVSRLEHA | Pep |
| 53 | LMQLARQMKQLADSLMQLARQVSRLESA | Pep |
| 54 | MKELADSLMQLARQVDRLESA | Pep |
| 55 | MKQLADSLHQLAHQVSHLEHA | Pep |
| 56 | PHFRFSFSP | Pep |
| 57 | PHFSFSFSP | Pep |
| 58 | PSFRFSFSP | Pep |
| 59 | MEELADSLEELARQVEELESA | Pep |
| 60 | MKKLADSLKKLARQVKKLESA | Pep |
| 61 | PHFHFSFSP | Pep |
| 62 | PHFSFHFSP | Pep |
| 63 | MKQLADSLHQLAHKVSHLEHA | Pep |
| 64 | EISALEKEISALEKEISALEK | Pep |
| 65 | KISALKEKISALKEKISALKE | Pep |
| 66 | RADARADARA DARADA | Pep |
| 67 | VKVVKVKVKG PPTKVVKVKV V | Pep |
| 68 | EAEPED | SU no helicoïdal |
| 69 | PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGD | Pep |
| 70 | PGERKRLIGCSVMTKPAGD | Pep |
| 71 | PGKWKLFKKIPKFLHLAKKFGN | Pep |
| 72 | ERKRLIGCSVMTKPA | Pep (Min corto) |
| 73 | GAAAAAAAAASGP | SA |

ES 2 763 168 T3

| | | |
|-----------|---|---|
| <p>74</p> | <p>GGATCCATGGGCGCTGCAGCGGCAGCTGCCGCGGCTT- CTGGTCCGGGTGAGTGGGAGCTGTTTGAAGAGATCA- GCGAATTCCTGCAGTCTCTGGAAGAGTTCGGTGGCCCCGGGT- CCTCTGCTGCTGCGGCTGCAGCTGCGGCAGGCCCGGGCGAC- CCAGGTAATGGAACTGTTTAAGAAAATCCGAAATT- CCTGCATCTGGCTAAAAAATTCGGTGACCCGGGT- CCTCTGCTGCGGCTGCAGCTGCAGCTGCGTCCGGTCCGGGT- GAATGGGAACTGTTTGAAGAAATCTCCGAATT- CCTGCAGTCTCTGGAAGAATT- CGGCGGTCCGGGCGCTGCCGCTGCAGCGGCAGCGGCTGGTCC TGGCGACCCGGGCAAATGGAACTGTT- TAAGAAAATCCCGAAATTTCTGCATCTGGCTAAAAAGTT- CGGCGATCCGGGCTAATGAAAGCTT</p> | <p>AHe2AP18₂ Constructo</p> |
| <p>75</p> | <p>MASMTGGQQMGRGSMGAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGS- SAAAAAAAAAGPGDPGKWLFFKIPKFLHLAKKFGDPGS- SAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGAAAAAAAAAGPGDPGKWLFFKIPK- FLHLAKKFGDPGAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGS- SAAAAAAAAAGPGDPGKWLFFKIPKFLHLAKKFGDPGS- SAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGAAAAAAAAAGPGDPGKWLFFKIPK- FLHLAKKFGDPG</p> | <p>AHe2AP18₄ Péptido precursor</p> |
| <p>76</p> | <p>GGATCCATGGGCGCTGCAGCGGCAGCTGCCGCGGCTT- CTGGTCCGGGTGAGTGGGAGCTGTTTGAAGAGATCA- GCGAATTCCTGCAGTCTCTGGAAGAGTTCGGTGGCCCCGGGT- CCTCTGCTGCTGCGGCTGCAGCTGCGGCAGGCCAGGCGACA AATGGAACTGTTTAAGAAAATCCGAAATT- CCTGCATCTGGCTAAAAAATTCGACCCGGGT- CCTCTGCTGCGGCTGCAGCTGCAGCTGCGTCCGGTCCGGGT- GAATGGGAACTGTTTGAAGAAATCTCCGAATT- CCTGCAGTCTCTGGAAGAATT- CGGCGGTCCGGGCGCTGCCGCTGCAGCGGCAGCGGCTGGTCC TGGCGACAAATGGAACTGTTTAAGAAAATCCCGAAATTT- CTGCATCTGGCTAAAAAGTTTCGATCCGGGCTAATGAAAGCTT</p> | <p>AHe2AP18- PG₂ Constructo</p> |

| | | |
|--|---|--|
| 77 | <p>MGAAAAAAAAASGPGEWELFEEISEFLQSLEEFGGPGS- SAAAAAAAAAGPGDKWKLFFKKIPKFLHLAKKFDPGSSAAAAAAAAAS- GPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGAAAAAAAAAGPGDKWKLFFKKIPK- FLHLAKKFDPGAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGSSAAAAAAAAAGPGDKWKLFFKKIPK- FLHLAKKFDPGSSAAAAAAAAASGPGE- WELFEEISEFLQSLEEFGGPGAAAAAAAAAGPGDKWKLFFKKIPK- FLHLAKKFDPG</p> | <p>AHe2AP18- PG₄</p> <p>Péptido precursor</p> |
| <p>SA = secuencia autoensamblante</p> <p>SU = péptido protector</p> <p>Pep = péptido que debe producirse</p> | | |

5 De manera complementaria con respecto a las secuencias de aminoácidos Pep concretas antes descritas, las secuencias C-terminal y/o N-terminal indicadas en el listado pueden estar modificadas mediante la adición de secuencias de escisión específicas (por ejemplo para una escisión de ácido entre los radicales "DP"; o una escisión de hidroxilamina entre los radicales "NG") o mediante los radicales de aminoácidos restantes, que resultan de las escisiones de esa clase. Eventualmente, de manera adicional, entre la secuencia de escisión y la secuencia Pep, puede estar insertado un radical espaciador, como por ejemplo un radical G. En particular pueden mencionarse las siguientes variantes de las secuencias Pep anteriores, las cuales pueden resultar de la escisión de ácido o de hidroxilamina de secuencias Pep producidas según la invención:

10 N-terminal: adición de un radical PG, P o G;

C-terminal: adición de un radical GD; GN; G; N o D

Las variaciones de esa clase aplican en particular para cada una de las secuencias Pep individuales anteriores, en particular según SEQ ID NO:6 a 15, 29 a 67 y 72

Se hace referencia de forma expresa a la descripción de las publicaciones aquí mencionadas

15 Listado de secuencias

<110> BASF SE

<120> Producción recombinante de péptidos

<130> M/49358

<160> 77

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido

<400> 1

Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro
1 5 10

<210> 2

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

10 <400> 2

Gly Ser Ser Ala Ser Gly Pro
1 5 10 15

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 3

Gly Ser Ala Ser Gly Pro
1 5 10

20 <210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido

<400> 4

Gly Ser Val Val Val Val Val Val Val Val Ser Gly Pro

1

5

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 5

Gly Ser Val Val Ala Ala Val Val Ala Ala Ser Gly Pro
1 5 10

10 <210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido P18

<400> 6

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

<210> 7

<211> 19

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo de secuencia 1

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

- <222> (1)..(1)
<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
- 5 <222> (2)..(2)
<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
- 10 <223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>
- 20 <221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = ausente o es Pro o Pro-Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
- 25 <222> (13)..(13)
<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
- 30 <223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro
<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa = aminoácido básico o aminoácido hidrófobo diferente de Pro

<400> 7

Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Lys Ile Pro Xaa Lys Phe Xaa Xaa Xaa Ala
1 5 10 15

Xaa Lys Phe

10 <210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Motivo de secuencia 2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Lys, Arg o Phe

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Lys o Trp

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Leu o Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Phe o Leu
<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Leu o Lys
<220>

<221> MISC_FEATURE
10 <222> (10)..(10)
<223> Xaa = Pro o ausente
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
15 <223> Xaa = Pro o ausente
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Leu o Lys
20 <220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa = His o Lys
<220>

25 <221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa = Ala, Leu, Val o Ser
<220>

<221> MISC_FEATURE
30 <222> (18)..(18)
<223> Xaa = Leu o Lys

ES 2 763 168 T3

<400> 8

Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Lys Ile Pro Xaa Xaa Lys Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Ala Xaa Lys Phe
20

<210> 9

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 9

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Pro Lys Phe Leu His Leu Ala
1 5 10 15

Lys Lys Phe

10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido RP18

<400> 10

Arg Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

<210> 11

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido KKFP18

<400> 11

Phe Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Ala Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

5 <210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido KKLP18

<400> 12

Lys Trp Lys Leu Leu Lys Lys Ile Pro Lys Phe Lys Lys Leu Ala Leu
1 5 10 15

Lys Phe

<210> 13

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido AP18

<400> 13

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Ala Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

20

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido KFLP18

5 <400> 14

Lys Trp Lys Lys Phe Leu Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Ala Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido KLLP18

<400> 15

Lys Trp Lys Lys Leu Leu Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Ala Ala Lys
1 5 10 15

Lys Phe

15 <210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido

<400> 16

Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe
1 5 10

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

5 <400> 17

Glu Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu
1 5 10 15

Glu Phe

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 18

Glu Leu Phe Glu Glu Leu Ala Glu Phe Leu Gln Gln Leu Glu Glu Phe
1 5 10 15

Ile Glu

15 <210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido

<400> 19

Leu Phe Glu Glu Leu Gln Glu Phe Leu Gln Ala Leu Glu Glu Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Ala Leu Gln Phe Leu Ala Ala Phe Leu Gln Phe Ser
20 25 30

<220>

<223> Polipéptido

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(15)

<223> T7-Tag

<400> 22

```
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly
 1                5                10                15

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu
          20                25                30

Ala His Val Met His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys
          35                40                45

Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly
 50                55                60
```

ES 2 763 168 T3

Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly
 65 70 75 80

 Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

 Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met His Lys Val Ala
 100 105 110

 Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala
 115 120 125

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met
 130 135 140

 His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly
 145 150 155 160

 Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu
 165 170 175

 Ala His Val Met His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys
 180 185 190

 Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly
 195 200 205

 Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly
 210 215 220

 Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 225 230 235 240

 Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met His Lys Val Ala
 245 250 255

 Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala
 260 265 270

 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Glu Ala His Val Met
 275 280 285

 His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser Cys Gly Asp Pro Gly
 290 295 300

<210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Péptido P18

<400> 23

Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe Gly
20

<210> 24

10 <211> 450

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Gen sintético

15 <400> 24

ggatccatgg gctctagcgc tgcagcggca gctgccgcgg cttctgggtcc gggctctgttc 60
gaagagatct ccgaattcct gcagtctctg gaagagttcg gtggcccggg ttcctctgca 120
gctgcggctg cagctgcggc aagcggccct gaccaggtta aatggaaact gtttaagaaa 180
attccgaaat tcttgcattc ggctaaaaaa ttccggtgacc cgggttcttc cgctgcggct 240
gcagctgcag ctgcgtccgg tccgggtctg ttccgaagaaa tctccgaatt cctgcagtct 300
ctggaagaat tcggcgggtcc gggctctagc gctgccgctg cagcggcagc ggcttccggc 360
ccggaccggg gcaaattggaa actgtttaag aaaatcccga aatttctgca tctggctaaa 420
aagttcggcg atccgggcta atgaaagctt 450

<210> 25

<211> 300

<212> PRT

20 <213> Artificial

ES 2 763 168 T3

<220>

<223> Polipéptido

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(15)

<223> T7-Tag

<400> 25

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Leu Phe
20 25 30

ES 2 763 168 T3

Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro
 50 55 60
 Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala
 65 70 75 80
 Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Ser Gly Pro Gly Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser
 100 105 110
 Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile
 130 135 140
 Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Leu Phe Glu Glu
 165 170 175
 Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ser
 180 185 190
 Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Asp Pro Gly Lys
 195 200 205
 Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys
 210 215 220
 Phe Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser
 225 230 235 240
 Gly Pro Gly Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu
 245 250 255
 Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Pro Asp Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys
 275 280 285
 Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly

ES 2 763 168 T3

290

295

300

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 26

Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro
 1 5 10 15

Ala Gly

10 <210> 27

<211> 516

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Gen sintético

<400> 27

```

ggatccatgg gctcttccgc tgcagccgct gcagctgcgg ctgcatccgg tccggaggca      60
gagccggaag acccggtga acgtaaactg ctgatcgggt gttctgtaat gaccaaactt      120
gctggtgatc cgggctccag cgctgcggct gcggcagctg cagcggcctc tgggtccggag      180
gcggaaccgg aggaccggg tgaacgtaag cgcctgatcg gctgcagcgt gatgaccaa      240
ccggctggtg atccgggttc ttccgcggtc gcagctgcgg cagctgcagc tagtgggtcca      300
gaagcagaac cagaagacce ggggtgaactg aaacgtctga ttggttgctc tgttatgact      360
aaaccggctg gtgaccggg ctcttccgcg gctgcccgcg ctgcccgtgc agctagcggc      420
ccggaagctg aaccggaaga tccgggcaaa cgcaagcgtc tgatcggctg ctccggtatg      480
actaaaccgg ctggcgacce gggctaatga aagctt                                     516
  
```

<210> 28

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> T7-Tag

<400> 28

ES 2 763 168 T3

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Gly Pro Glu Ala
20 25 30

Glu Pro Glu Asp Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val
35 40 45

Met Thr Lys Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala
50 55 60

Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Glu Ala Glu Pro Glu Asp Pro Gly Glu
65 70 75 80

Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro Ala Gly Asp
85 90 95

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro
100 105 110

Glu Ala Glu Pro Glu Asp Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys
115 120 125

Ser Val Met Thr Lys Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala
130 135 140

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Glu Ala Glu Pro Glu Asp Pro
145 150 155 160

Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro Ala
165 170 175

Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser
180 185 190

Gly Pro Glu Ala Glu Pro Glu Asp Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile
195 200 205

Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala
210 215 220

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Glu Ala Glu Pro Glu
225 230 235 240

Asp Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys
245 250 255

Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

His Gly Gly Gly His Gly His Gly Gly Gly His Gly
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 31

His Tyr Pro Thr Leu Pro Leu Gly Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

10 <210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido

<400> 32

Ala Leu Ser Pro His Ser Ala Pro Leu Thr Leu Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 33

Ser Ala Gly Arg Leu Ser Ala
1 5

25

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Polipéptido

<400> 34

Thr Leu Pro Asn His Thr Val
1 5

<210> 35

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

15 <400> 35

His Thr Ser Lys Leu Gly Ile
1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 36

Met Ser Pro His Pro His Pro Arg His His His Thr Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

25 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 37

Glu Ala His Val Met His Lys Val Ala Pro Arg Pro Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Cys

5

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Polipéptido

<400> 38

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Arg Arg
1 5 10 15

Ile Leu

<210> 39

15 <211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

20 <400> 39

Pro Tyr Ala Tyr Met Lys Ser Arg Asp Ile Glu Ser Ala Gln Ser Asp
1 5 10 15

Glu Glu Val Glu Leu Arg Asp Ala Leu Ala Asp
20 25

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Polipéptido

<400> 40

Pro Gly Tyr Gly Tyr Tyr Lys Asn Arg Asn Ala Glu Pro Ala Ala Ala
1 5 10 15

Glu Ala Val Asp
20

<210> 41

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 41

Pro Gly Lys Ser Arg Asp Ile Glu Ser Ala Gln Ser Asp Glu Glu Val
1 5 10 15

Glu Leu Arg Asp
20

15

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido

<400> 42

Pro Gly Lys Ser Arg Asp Ala Glu Pro Ala Ala Ala Gly Glu Glu Val
 1 5 10 15

Asp

<210> 43

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 43

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Gly Gly Asn Pro Ser Ser Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Ser
 20 25 30

Asp

10 <210> 44

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido

<400> 44

Met Ser Pro His Pro His Pro Arg His His His Thr Gly Gly Gly Asn
 1 5 10 15

Pro Ser Ser Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Ser Asp
 20 25

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

5 <400> 45

Asn Pro Ser Ser Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Ser Asp Gly Gly Gly Arg
1 5 10 15

Arg Glu Glu Trp Trp Asp Asp Arg Arg Glu Glu Trp Trp Asp Asp
20 25 30

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 46

Met Ser Pro His Pro His Pro Arg His His His Thr Gly Gly Gly His
1 5 10 15

Gly Gly Gly His Gly His Gly Gly Gly His Gly
20 25

15 <210> 47

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido

<400> 47

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Gly Gly His Gly Gly Gly His Gly His Gly Gly Gly His
 20 25 30

Gly

<210> 48

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 48

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Gly Gly His Tyr Pro Thr Leu Pro Leu Gly Ser Ser Thr
 20 25 30

Tyr

10 <210> 49

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido

<400> 49

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Arg Arg
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Gly Gly Ser Ala Gly Arg Leu Ser Ala
 20 25

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Polipéptido

<400> 50

Arg Arg Glu Glu Trp Trp Asp Asp Arg Arg Glu Glu Trp Trp Asp Asp
1 5 10 15

<210> 51

10 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

15 <400> 51

Met Lys Gln Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Val Ser
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ser Ala
20

<210> 52

<211> 21

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 52

ES 2 763 168 T3

Met Lys Gln Leu Ala Asp Ser Leu His Gln Leu Ala Arg Gln Val Ser
1 5 10 15

Arg Leu Glu His Ala
20

<210> 53

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 53

Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Met Lys Gln Leu Ala Asp Ser Leu Met
1 5 10 15

Gln Leu Ala Arg Gln Val Ser Arg Leu Glu Ser Ala
20 25

10 <210> 54

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido

<400> 54

Met Lys Glu Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln Leu Ala Arg Gln Val Asp
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ser Ala
20

<210> 55

<211> 21

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 55

Met Lys Gln Leu Ala Asp Ser Leu His Gln Leu Ala His Gln Val Ser
1 5 10 15

His Leu Glu His Ala
20

5 <210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido

<400> 56

Pro His Phe Arg Phe Ser Phe Ser Pro
1 5

<210> 57

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 57

Pro His Phe Ser Phe Ser Phe Ser Pro
1 5

20

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

ES 2 763 168 T3

<223> Polipéptido

<400> 58

Pro Ser Phe Arg Phe Ser Phe Ser Pro
1 5

<210> 59

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

10 <400> 59

Met Glu Glu Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gln Val Glu
1 5 10 15

Glu Leu Glu Ser Ala
20

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 60

Met Lys Lys Leu Ala Asp Ser Leu Lys Lys Leu Ala Arg Gln Val Lys
1 5 10 15

Lys Leu Glu Ser Ala
20

20 <210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 61

Pro His Phe His Phe Ser Phe Ser Pro
1 5

5 <210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido

<400> 62

Pro His Phe Ser Phe His Phe Ser Pro
1 5

<210> 63

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 63

Met Lys Gln Leu Ala Asp Ser Leu His Gln Leu Ala His Lys Val Ser
1 5 10 15

His Leu Glu His Ala
20

20

<210> 64

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido

<400> 64

Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile
1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Lys
20

<210> 65

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

10 <400> 65

Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile
1 5 10 15

Ser Ala Leu Lys Glu
20

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

20 <210> 67

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 67

Val Lys Val Lys Val Lys Val Lys Val Gly Pro Pro Thr Lys Val Lys
1 5 10 15

Val Lys Val Lys Val
20

5 <210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido

<400> 68

Glu Ala Glu Pro Glu Asp
1 5

<210> 69

<211> 22

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 69

Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe Gly Asp
20

20

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 70

Pro Gly Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Asp

5

<210> 71

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Péptido

<400> 71

Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
 1 5 10 15

Ala Lys Lys Phe Gly Asn
 20

<210> 72

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

20 <400> 72

Glu Arg Lys Arg Leu Ile Gly Cys Ser Val Met Thr Lys Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 73

<211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido

5 <400> 73

Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro
 1 5 10

<210> 74
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Gen sintético
 <400> 74

10 <213> Artificial

<220>
 <223> Gen sintético
 <400> 74

```

ggatccatgg gcgctgcagc ggcagctgcc gcggcttctg gtccgggtga gtgggagctg      60
ttcgaagaga tcagcgaatt cctgcagtct ctggaagagt tcggtggccc gggttcctct      120
gctgctgcgg ctgcagctgc ggcaggcccg ggcgaccag gtaaatggaa actgtttaag      180
aaaattccga aattcctgca tctggctaaa aaattcgggtg acccgggttc ctctgctgcg      240
gctgcagctg cagctgcgtc cgggccgggt gaatgggaac tgttcgaaga aatctccgaa      300
ttcctgcagt ctctggaaga attcggcggt ccgggcgctg ccgctgcagc ggcagcggct      360
ggtcctggcg acccgggcaa atggaaactg ttaagaaaa tcccgaatt tctgcatctg      420
gctaaaaagt tcggcgatcc gggctaatga aagctt      456
    
```

15 <210> 75
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido
 <400> 75

ES 2 763 168 T3

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu
 20 25 30

Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly
 35 40 45

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp
 50 55 60

Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
 65 70 75 80

Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu
 100 105 110

Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys
 130 135 140

ES 2 763 168 T3

Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly
145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu
165 170 175

Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp
195 200 205

Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
210 215 220

Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala
225 230 235 240

Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu
245 250 255

Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ala Ala Ala Ala
260 265 270

Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp Pro Gly Lys Trp Lys Leu Phe Lys
275 280 285

Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Gly Asp Pro Gly
290 295 300

<210> 76

<211> 438

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Gen sintético

<400> 76

ES 2 763 168 T3

ggatccatgg gcgctgcagc ggcagctgcc gcggcttctg gtccgggtga gtgggagctg 60
ttcgaagaga tcagcgaatt cctgcagtct ctggaagagt tcggtggccc gggttcctct 120
gctgctgctg ctgcagctgc ggcaggccca ggcgacaaat ggaaactgtt taagaaaatt 180
ccgaaattcc tgcattctggc taaaaaatc gaccocgggtt cctctgctgc ggctgcagct 240
gcagctgcgt ccggtccggg tgaatgggaa ctgttcgaag aatctccga attcctgcag 300
tctctggaag aattcggcgg tccgggcgct gccgctgcag cggcagcggc tggtcctggc 360
gacaaatgga aactgtttaa gaaaatcccg aaatttctgc atctggctaa aaagtccgat 420
ccgggctaata gaaagctt 438

<210> 77

<211> 278

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido

<400> 77

ES 2 763 168 T3

Met Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp
1 5 10 15

Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe
20 25 30

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
35 40 45

Gly Asp Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu
50 55 60

Ala Lys Lys Phe Asp Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
65 70 75 80

Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala
100 105 110

Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro
115 120 125

Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Asp Pro Gly Ala Ala Ala Ala
130 135 140

Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile
145 150 155 160

Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu Phe Gly Gly Pro Gly Ser Ser
165 170 175

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly Asp Lys Trp Lys Leu
180 185 190

Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala Lys Lys Phe Asp Pro
195 200 205

Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Glu
210 215 220

ES 2 763 168 T3

Trp Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ser Glu Phe Leu Gln Ser Leu Glu Glu
225 230 235 240

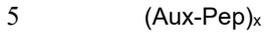
Phe Gly Gly Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro Gly
245 250 255

Asp Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Pro Lys Phe Leu His Leu Ala
260 265 270

Lys Lys Phe Asp Pro Gly
275

REIVINDICACIONES

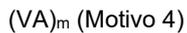
1. Proteína precursora que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general



en donde x es >1, donde

los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA))

10 donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:



en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6; y

20 los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora,

donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente de forma específica, donde las secuencias de escisión comprenden un motivo de secuencia, seleccionado entre NG y DP.

25 2. Proteína precursora que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general



en donde x es >1, donde

30 los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA))

donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:



(VVAA)_o (Motivo 5)

en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6; y

5 los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora,

donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente o enzimáticamente de forma específica, donde

10 a) el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada entre las secuencias de aminoácidos catiónicas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 69 a SEQ ID NO: 72, o

b) el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 29 a 67.

15 3. Proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes, la cual forma productos de asociación estables que no pueden disolverse mediante 0,2 M NaOH dentro de una hora o mediante 2 M urea o 1 M cloruro de guanidinio dentro de 10 min a temperatura ambiente.

4. Proteína precursora según la reivindicación 2 ó 3, en donde el elemento SA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO; 73.

20 5. Proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un péptido Aux comprende además un elemento (SU) de péptido protector, el cual presenta una parte aumentada de radicales de aminoácidos cargados de forma negativa.

6. Proteína precursora según la reivindicación 5, donde el elemento SU en la proteína precursora es capaz de formar una estructura de hélice anfifílica.

25 7. Proteína precursora según la reivindicación 6, donde el elemento SU es un péptido anfifílico, el cual comprende un segmento de secuencia de al menos siete aminoácidos vinculados mediante péptidos, los cuales son capaces de formar una hélice alfa anfifílica, donde la hélice, en su proyección vertical, presenta una separación de radicales de aminoácidos en una mitad de la hélice hidrófoba y una mitad de la hélice hidrófila, la mitad de la hélice hidrófoba presenta al menos 3 radicales de aminoácidos hidrófobos iguales o distintos contiguos (en la proyección vertical), y
30 la mitad de la hélice hidrófila presenta al menos 3 radicales de aminoácidos hidrófilos iguales o distintos contiguos (en la proyección vertical).

8. Proteína precursora según la reivindicación 5, 6 ó 7, donde la parte de radicales de aminoácidos cargada del elemento U está seleccionada de manera que la carga neta total de la proteína precursora en el caso de pH=7 es mayor que - 10 y menor que + 10.

35 9. Proteína precursora según una de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el elemento SU comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 68.

10. Proteína precursora según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 9, donde el elemento Pep comprende una secuencia de péptidos catiónica antimicrobiana.

40 11. Proteína precursora según la reivindicación 10, donde el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos catiónicas SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 69 a SEQ ID NO: 72.

45 12. Proteína precursora según una de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, en donde el elemento Pep comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 29 a 67.

13. Proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes, donde los elementos Aux, independientemente unos de otros, poseen uno de los siguientes significados:

SA,

SA-SU,

SU-SA,

SA-SU-SA,

5 SU-SA-SU,

en donde los elementos SA y SU están vinculados unos con otros mediante péptidos y los elementos Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos de forma terminal con al menos un elemento Pep, y ese enlace peptídico con respecto a los elementos Pep puede escindirse específicamente de forma química o enzimática.

10 14. Secuencia de ácido nucleico codificante para al menos una proteína precursora según una de las reivindicaciones precedentes

15. Secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 14, la cual comprende al menos una secuencia codificante según SEQ ID NO: 21, 24, 27, 74, y 76.

16. Casete de expresión que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 14 ó 15, vinculado de forma operativa con al menos una secuencia de ácido nucleico reguladora.

15 17. Vector recombinante para la transformación de un huésped eucariota o procariota, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 14 ó 15, o un casete de expresión según la reivindicación 16.

18. Procedimiento para producir un péptido (Pep) deseado, en donde

a) se produce una proteína precursora,

20 que comprende una secuencia repetitiva escindible de elementos de péptido (Pep) deseados y elementos de péptido auxiliar (Aux), de la fórmula general

$(\text{Pep-Aux})_x$ o

$(\text{Aux-Pep})_x$

en donde x es >1, donde

25 los elementos Aux son idénticos o diferentes y comprenden elementos de secuencia de aminoácidos que otorgan a la proteína precursora propiedades autoensamblantes, donde el elemento Aux comprende un péptido autoensamblante (elemento (SA))

donde el elemento SA contiene al menos uno de los siguientes motivos de secuencia:

A_n (Motivo 1)

30 $(GA)_m$ (Motivo 2)

V_n (Motivo 3)

$(VA)_m$ (Motivo 4)

$(VVAA)_o$ (Motivo 5)

35 en donde A representa alanina, G glicina, V valina, n un valor entero de 8 a 12, m un valor entero de 4 a 10, y o un valor entero de 2 a 6; y

los elementos Pep son iguales o distintos, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la molécula del péptido igual o distinta, con una longitud de la secuencia de 5 - 70 radicales de aminoácido, y los elementos Pep están

flanqueados por secuencias de escisión que posibilitan una escisión específica de los elementos Pep desde la proteína precursora,

donde los elementos Pep y Aux están vinculados unos con otros mediante péptidos y el enlace peptídico puede escindirse químicamente de forma específica, y

5 b) los péptidos Pep se escinden desde la proteína precursora.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, donde la proteína precursora se produce en un microorganismo recombinante, el cual porta al menos un vector según la reivindicación 17.

10 20. Procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, donde la proteína precursora forma productos de asociación estables que no pueden disolverse mediante 0,2 M NaOH dentro de una hora o mediante 2 M urea o 1 M cloruro de guanidinio dentro de 10 min a temperatura ambiente.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 18 a 20, donde la proteína precursora está definida como en una de las reivindicaciones 4 a 13, o se codifica mediante una secuencia de ácidos nucleicos según una de las reivindicaciones 14 y 15.

A)

A1 – A2 – A3 – A4 – A5 – A6 – A7

B)

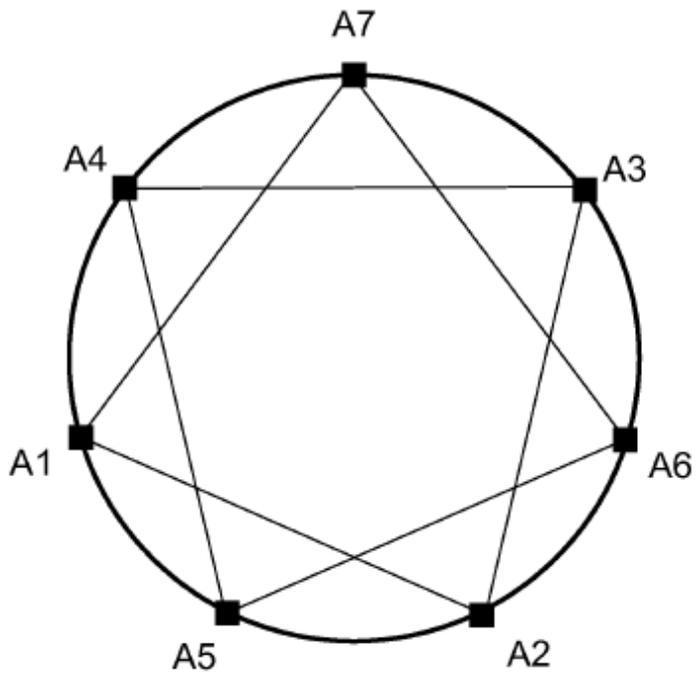


Fig.1

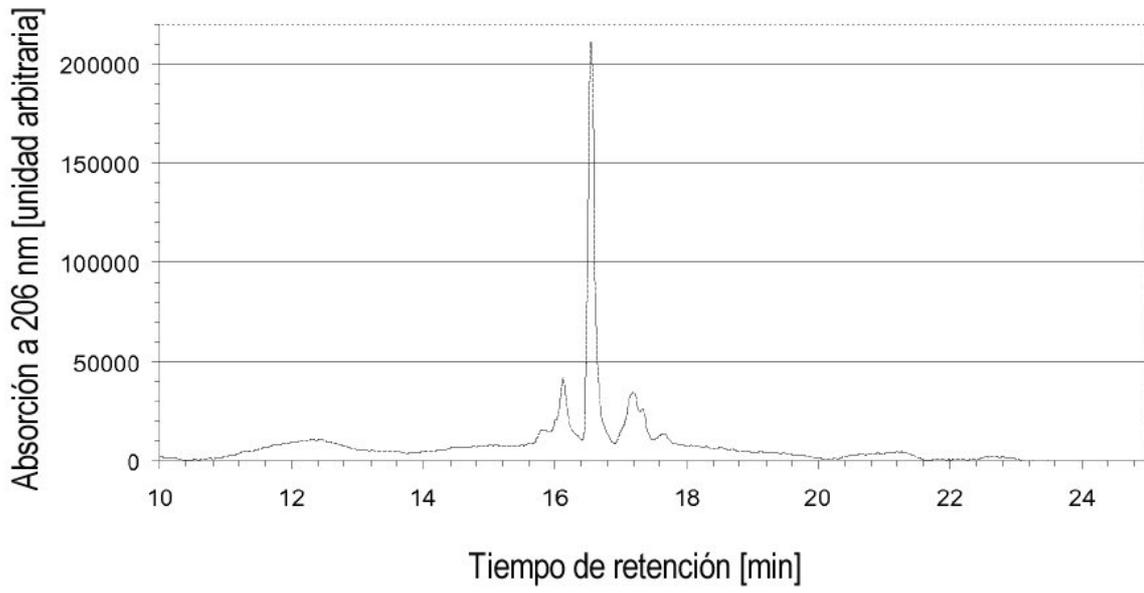


Fig. 2

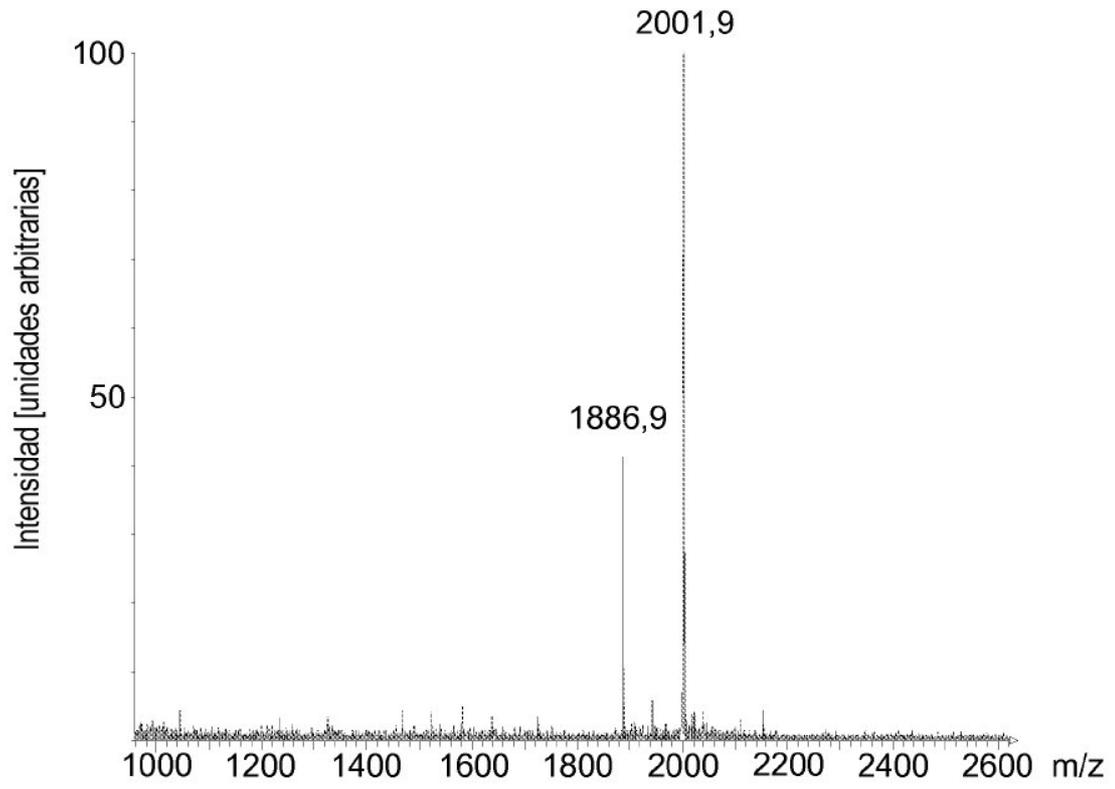


Fig. 3

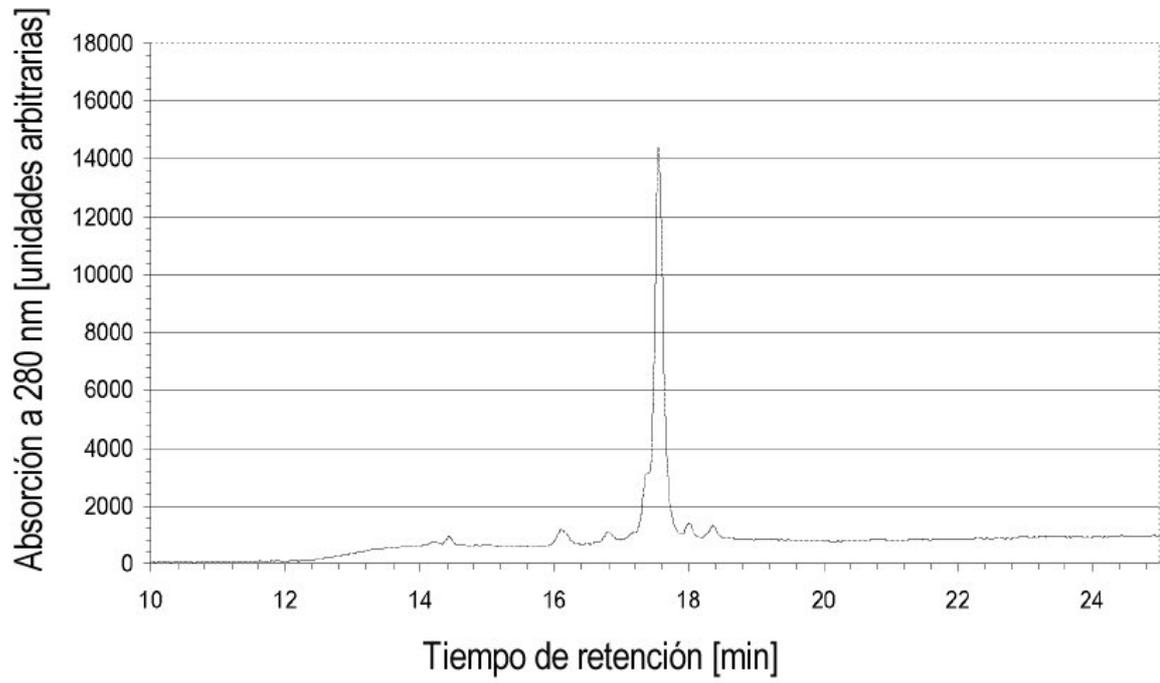


Fig. 4

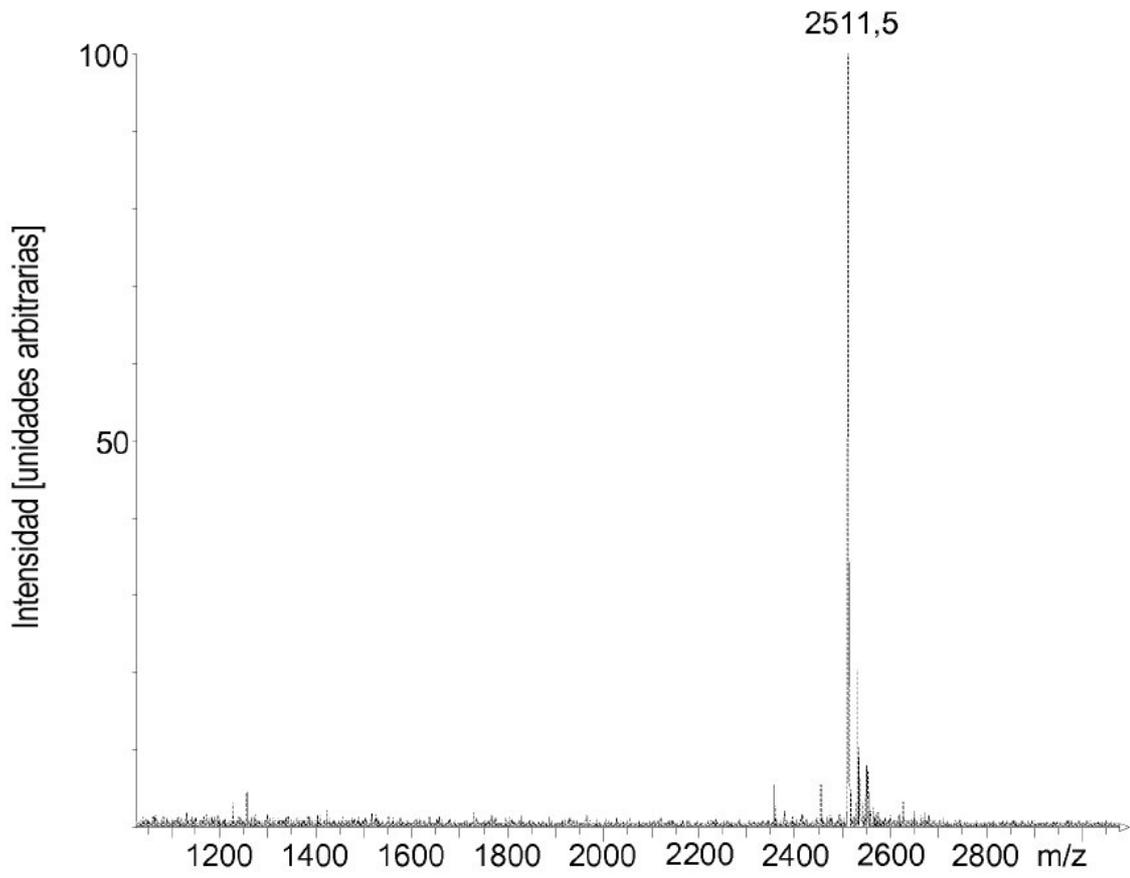


Fig. 5

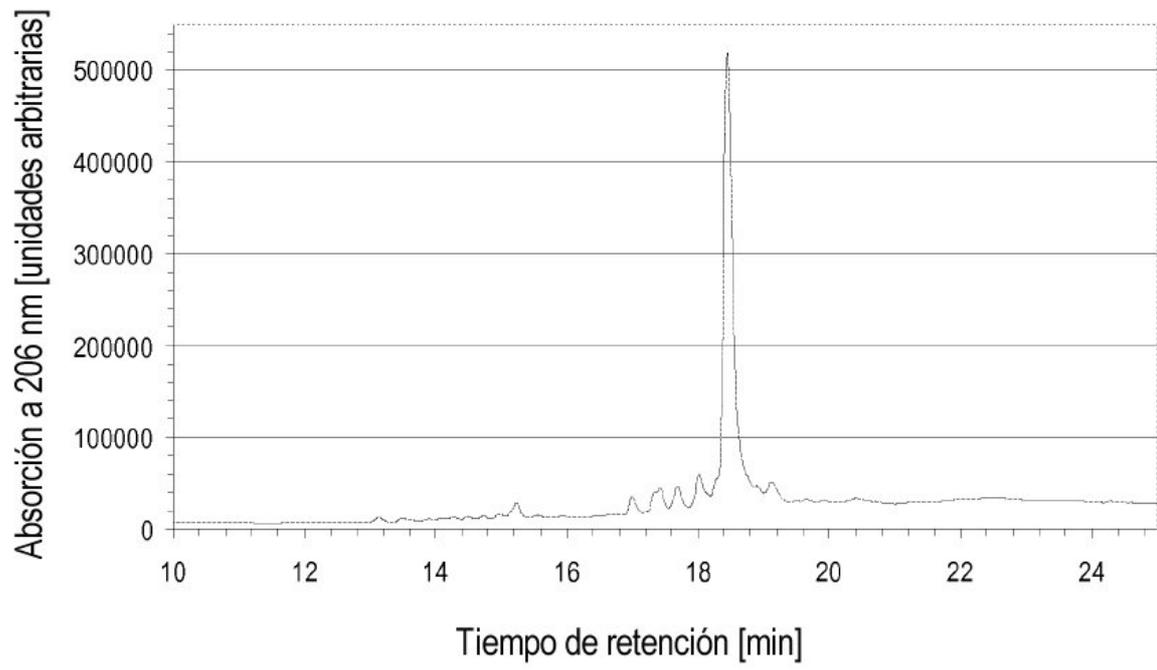


Fig. 6

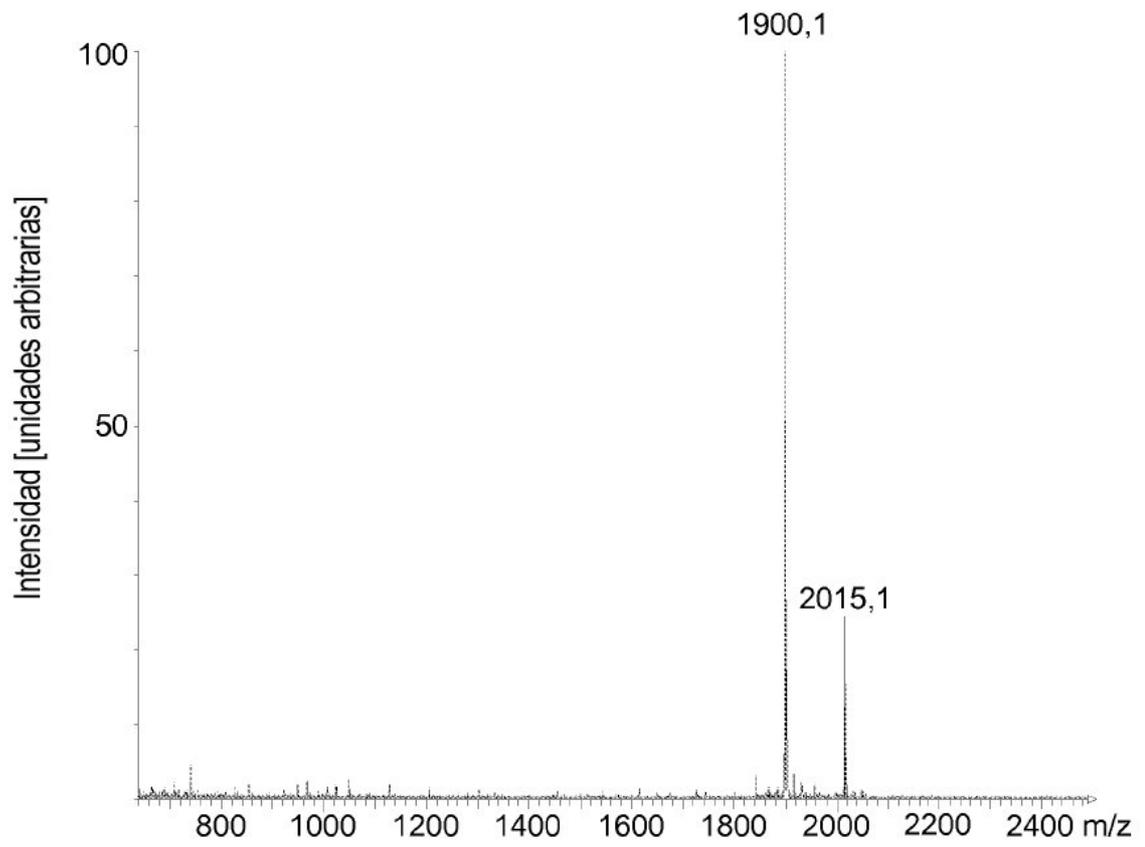


Fig. 7

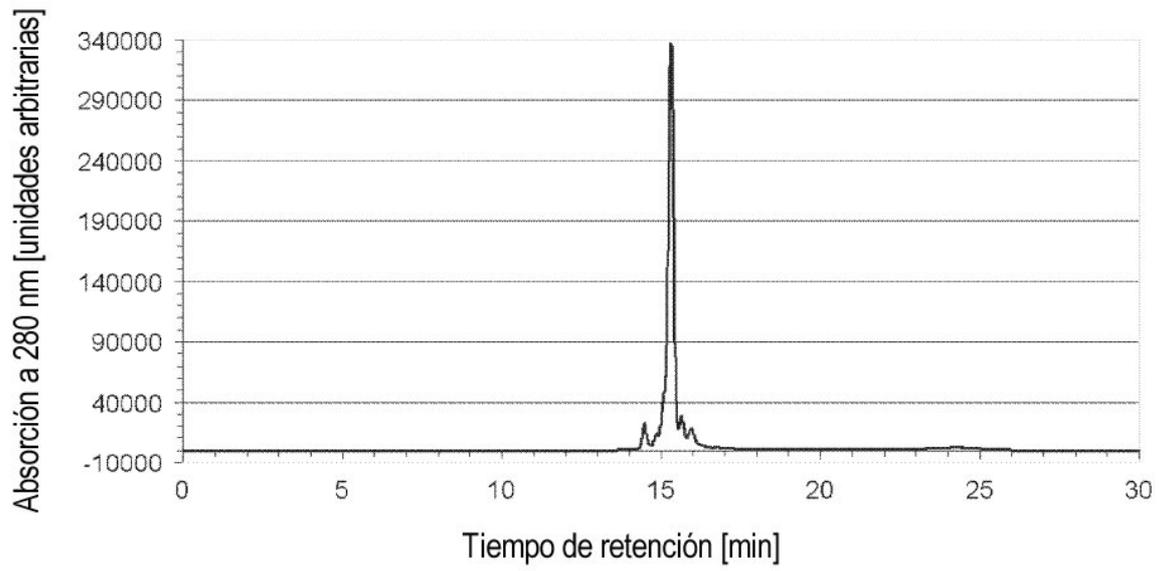


Fig. 8

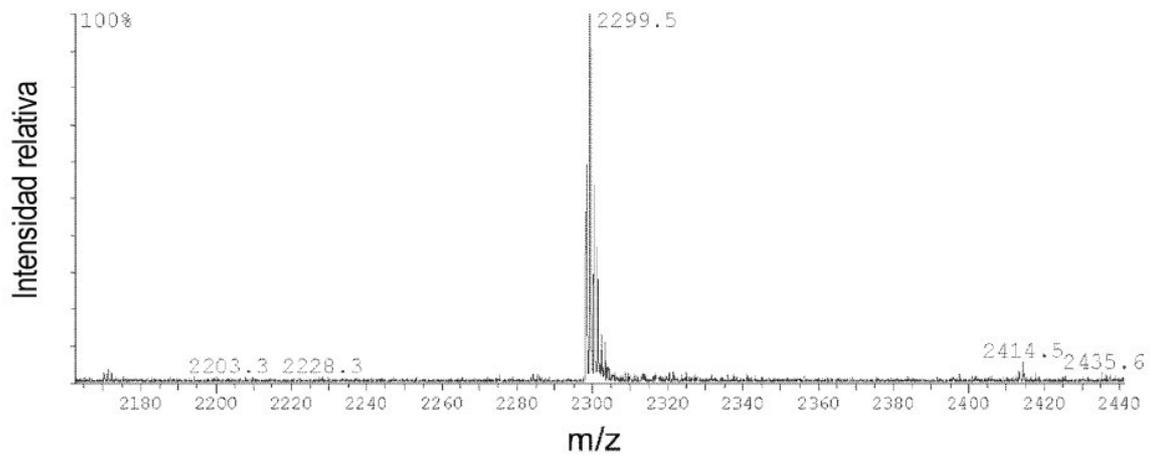


Fig. 9

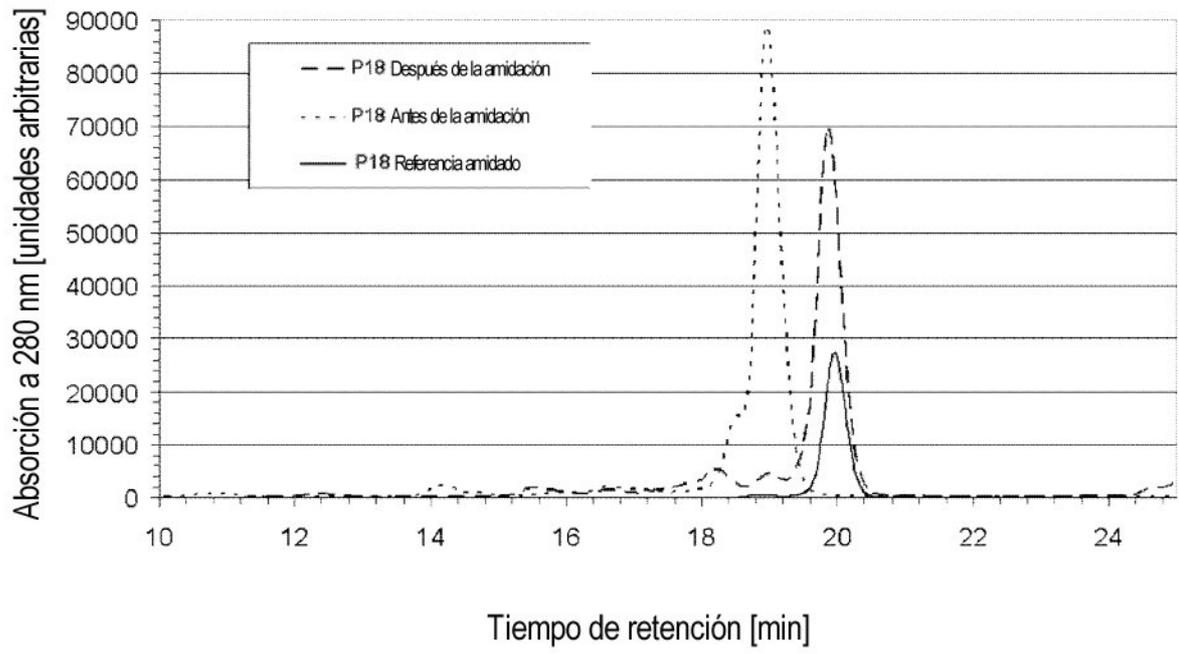


Fig. 10

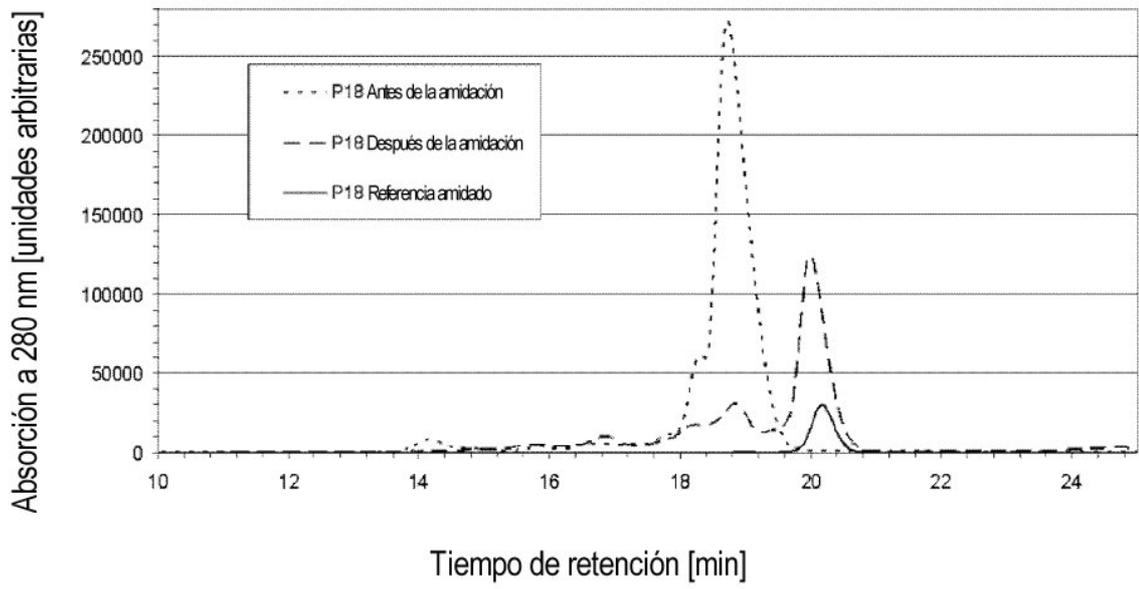


Fig. 11